

ÁCIDOS GRASOS Y FUNCIÓN CELULAR

Nuria María Fol Rodríguez

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
PROGRAMA INTERUNIVERSITARIO EN ENDOCRINOLOGÍA
FACULTAD DE VETERINARIA

LUGO
2015





A mi familia





AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia y dándome ánimo en los momentos difíciles.

Por ello quiero agradecer muy sinceramente:

En primer lugar a mis directores de Tesis, los profesores Jesús Casabiell y Luis De La Cruz. A Jesús, mi sincero agradecimiento por su paciencia, valiosa dirección y apoyo para llevar a cabo esta Tesis. Su experiencia y motivación han sido fundamentales durante estos años. A Luis, un especial agradecimiento por haberme recibido en el departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria y por sus consejos.

A los integrantes del departamento de Fisiología, Félix, Mercedes, Pepe, Merche por hacer mis días de trabajo en el laboratorio una experiencia agradable de la que solo me llevo buenos recuerdos.

A todos los compañeros del departamento: Javi, Henar, Isabel.

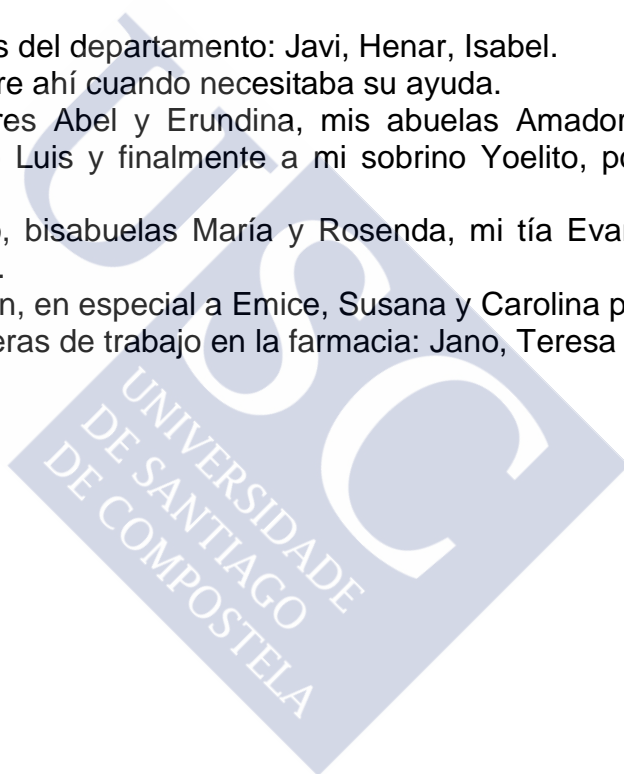
A Juan por estar siempre ahí cuando necesitaba su ayuda.

A mi familia: mis padres Abel y Erundina, mis abuelas Amadora y Escelina, mi hermana Eva, mi cuñado Luis y finalmente a mi sobrino Yoelito, por todo su apoyo durante este tiempo.

A mi abuelo Benedicto, bisabuelas María y Rosenda, mi tía Evangelina, y demás personas que ya no están.

A toda la familia de Juan, en especial a Emice, Susana y Carolina por confiar en mí.

Al titular y mis compañeras de trabajo en la farmacia: Jano, Teresa y Marta.





RESUMEN

El endotelio forma el revestimiento celular interno de los vasos sanguíneos y linfáticos. Las células endoteliales responden a estímulos físicos y químicos modulando el tono vascular, la permeabilidad vascular, la angiogénesis, la remodelación vascular, la respuesta inflamatoria y la hemostasia. En presencia de factores de riesgo cardiovascular (hipercolesterolemia, la hipertensión, la diabetes, el tabaquismo, etc.) se alteran estas funciones facilitando el desarrollo de la aterosclerosis. La dieta mediterránea ha sido relacionada con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares. Esta dieta entre sus principales características incluye la ingesta de baja cantidad de grasas saturadas, junto con cantidades relativamente altas de ácidos grasos monoinsaturados. Parte de sus efectos beneficiosos se atribuyen a los ácidos grasos en conformación *cis*, como el ácido oleico.

En el presente trabajo se estudiaron los efectos de los ácidos grasos saturados e insaturados con conformación *cis* y *trans* sobre dos aspectos fundamentales de la fisiología de las células endoteliales como son la progresión del ciclo celular y la fluidez de la membrana plasmática, involucrada en diversos mecanismos de transducción de señales. Los resultados indican que el ácido oleico induce proliferación celular, mientras que el ácido eláidico y esteárico no tienen este efecto. El ácido oleico inhibe la apoptosis inducida por la serodeprivación y el ácido eláidico tiene el mismo efecto pero de menor magnitud. Contrariamente, el ácido esteárico aumenta la apoptosis inducida por la serodeprivación. Los estudios de fluidez de membrana mostraron que el ácido oleico incrementa significativamente la fluidez de membrana de células endoteliales, mientras que los efectos de los ácidos eláidico y esteárico son cuantitativamente menores.

Los resultados obtenidos indican que la estructura de los ácidos grasos, así como su grado de insaturación, determinan la magnitud de sus efectos sobre el ciclo celular y la fluidez de la membrana plasmática en células endoteliales.

PALABRAS CLAVE

Células endoteliales, ácidos grasos, ácido oleico, ácido eláidico, ácido esteárico.

RESUMO

O endotelio forma o revestimento celular interno dos vasos sanguíneos e linfáticos. As células endoteliais responden a estímulos físicos e químicos modulando o tono vascular, a permeabilidade vascular, a angiogénese, o remodelado vascular, a resposta inflamatoria e a hemostasia. En presenza de factores de risco cardiovascular (hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes, tabaquismo, etc.) estas funcións altéranse facilitando o desenvolvemento da aterosclerose. A dieta mediterránea foi asociada a unha menor incidencia de enfermidades cardiovasculares. Esta dieta entre as súas principais características inclúe un baixo consumo de graxas saturadas, xunto con cantidades relativamente elevadas de ácidos graxos monoinsaturados. Parte dos seus efectos beneficiosos son atribuídos os ácidos graxos en conformación *cis*, como o ácido oleico.

Neste traballo estudáronse os efectos dos ácidos graxos saturados e insaturados con conformación *cis* e *trans* sobre dous aspectos fundamentais da fisioloxía das células endoteliais como son a progresión do ciclo celular e a fluidez da membrana plasmática, implicada en varios mecanismos de transdución de sinais. Os resultados indican que o ácido oleico induce a proliferación celular, mentres que o ácido esteárico e o eláidico non teñen este efecto. O ácido oleico inhibe a apoptose inducida pola serodeprivación, o ácido eláidico ten o mesmo efecto pero de menor magnitude. Contrariamente, o ácido esteárico aumenta a apoptose inducida pola serodeprivación. Os estudos de fluidez da membrana mostraron que o

ácido oleico aumenta significativamente a fluidez da membrana de células endoteliais, mentres que os efectos dos ácidos esteárico e elaídico son cuantitativamente menores.

Os resultados indican que a estrutura dos ácidos graxos, así como o seu grao de insaturación, determinan a magnitude dos seus efectos sobre o ciclo celular e a fluidez da membrana plasmática en células endoteliais.

PALABRAS CLAVE

Células endoteliais, ácidos graxos, ácido oleico, ácido elaídico, ácido esteárico.

SUMMARY

The endothelium forms the internal lining of blood and lymphatic vessels. Endothelial cells respond to physical and chemical stimuli modulating the vascular tone, the vascular permeability, angiogenesis, vascular remodeling, the inflammatory response, and hemostasis. In the presence of risk factors (hypercholesterolemia, hypertension, diabetes, smoking, etc.) these functions become altered allowing the development of atherosclerosis. The Mediterranean diet has been related with a lower incidence of cardiovascular diseases. This diet among its principal characteristics includes a low intake of saturated lipids together with a relatively high intake of monounsaturated fatty acids. Part of its beneficial effects are attributed to *cis*-monounsaturated fatty acids, like oleic acid.

In the present work, the effects of *cis* and *trans* unsaturated and saturated fatty acids have been studied focusing on their effect on two fundamental aspects of endothelial cell physiology, the progression of the cell cycle and the plasma membrane fluidity, involved in signal transduction to the inside of the cell. The results show that oleic acid induced endothelial cell proliferation, with no effect observed for elaidic and stearic acids. Oleic acid inhibited apoptosis induced by serodeprivation. The same effect, but with a lower magnitude, was observed for elaidic acid. On the contrary, stearic acid increased apoptosis induced by serodeprivation. Membrane fluidity studies showed that oleic acid significantly increased endothelial cells membrane fluidity, while quantitatively lower effects on this regard were observed for elaidic and stearic acids.

In summary, these results indicate that fatty acid structure, as well as their unsaturation ratio, define the magnitude of their effects on the cell cycle as well as on plasma membrane fluidity in endothelial cells.

KEY WORDS

Endothelial cells, fatty acids, oleic acid, elaidic acid, stearic acid.

INDICE

ABREVIATURAS	1
1-INTRODUCCIÓN	4
1.1-Endotelio vascular	4
1.2-Funciones del endotelio	5
1.3-Disfunción endotelial	14
1.4-Aterosclerosis	14
1.5-Dieta mediterránea	18
1.6-Ácidos grasos y sistema cardiovascular	23
1.7-Membranas biológicas	24
1.8-Efecto de los ácidos grasos libres sobre la señalización transmembrana	25
1.9-Ciclo celular	27
1.10-Apoptosis	30
1.11-Apoptosis en el endotelio vascular	32
2-OBJETIVOS	34
3-MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1- Cultivos celulares	35
3.2-Determinación espectrofluorimétrica de la proliferación celular	35
3.3-Estudio del ciclo celular y la apoptosis por citometría de flujo	36
3.4-Determinación de la fluidez de membrana por espectroscopía de fluorescencia	38
3.5-Análisis estadístico	41
4-RESULTADOS	42
4.1-Características morfológicas de los cultivos celulares	42
4.2-Ensayos de proliferación celular	42
4.3-Efecto del ácido oleico sobre la proliferación celular	44
4.4- Análisis del ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo	46
4.5-Efecto de los ácidos saturados y <i>trans</i> -insaturados sobre el ciclo celular a las 6 y a las 48 horas	54
4.6-Efecto de los ácidos elaídico y esteárico sobre el ciclo celular	59
4.7-Diferencias entre el ácido oleico, elaídico y esteárico en el ciclo celular	68
4.8-Efecto sobre la fluidez de membrana del ácido oleico, elaídico y esteárico	75
4.9-Efecto del suero fetal bovino sobre la fluidez de membrana	79
5-DISCUSIÓN	89
5.1-Estudio del efecto del ácido oleico, elaídico y esteárico sobre el ciclo celular y la inducción de apoptosis en células endoteliales MS-1	90
5.2-Estudio del efecto del ácido oleico, elaídico y esteárico sobre la fluidez de membrana en células MS-1	97



ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosín monofostato cíclico
BSA	Albúmina sérica bobina
AEI	Ácido elaídico
AEs	Ácido esteárico
AO	Ácido oleico
AUC	Área bajo la curva
$[Ca^{+2}]_i$	Concentración intracelular de Ca^{+2} libre
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CHO	Células de ovario de hámster
COX	Ciclooxygenasa
C	Citosina
DAG	Diacylglicerol
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
E2F	Factor de transcripción E2F
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EPC	Células progenitoras endoteliales de la médula ósea
ET-1	Endotelina-1
G	Guanina
Fase M	Fase de mitosis
Fase S	Fase de síntesis
FCS	Suero fetal bovino
FN-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
G0	Fase G0
G1	Fase G1
G2	Fase G2
GDP	Guanosín-difosfato
GH	Hormona de crecimiento
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín-trifosfato
HAEC	Células endoteliales de aorta humanas
HAM	Solución HAM
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HETE	Hidroieicosatetraenoico
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperacino-N'-2-etanosulfónico
HREC	Células endoteliales humanas de la retina
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana

IAP	Inhibidores de la apoptosis
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
I κ B	Inhibidores de κ B
IL	Interleucina
IP ₃	D-myo-inositol 1,4,5-trifosfato
IP	Ioduro de propidio
JAM	Moléculas de unión adhesión
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLc	LDL-colesterol
Lp(a)	Lipoproteína (a)
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
mRNA	RNA mensajero
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PAF	Factor activador de plaquetas
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno
PI 3-quinasa	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PI(3,4)P ₂	Fosfatidil inositol 3,4-bisfosfato
PI(3,4,5)P ₃	Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
PKA	Proteín-quinasa A
PKB	Proteín-quinasa B
PKC	Proteín-quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
MCP	proteína quimiotáctica de monocitos
P16	Proteína p16
P21	Proteína p21
P27	Proteína p27
P53	Proteína p53
PCAM	Moléculas de adhesión celular de plaquetas/endotelial
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PECAM	Molécula de adhesión de plaquetas a células endoteliales
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
pRb	Proteína del retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
T	Timina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina (TSH)
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VCAM	Moléculas de adhesión de células vasculares
VE-cadherina	Cadherina vascular endotelial
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VVOs	Vesículas vacuolares
vWF	Factor de vonWillebrand
ZO	Zone occludin







INTRODUCCIÓN



1-INTRODUCCIÓN

1.1-Endotelio vascular

El endotelio forma el revestimiento celular interno de los vasos sanguíneos y linfáticos. Es un órgano metabólicamente muy activo que está implicado en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos incluyendo, el control de tono vascular, la función de barrera y la adhesión de leucocitos e inflamación (Favero, Paganelli et al. 2014).

El término endotelio fue acuñado en 1865 por el anatomista Wilhelm His, el cual diferenció el revestimiento interno de las cavidades corporales del epitelio. Definió como endotelio las células que revisten los vasos sanguíneos, linfáticos y las cavidades mesoteliales. Esta definición fue modificada posteriormente incluyendo solo las células internas que revisten los vasos sanguíneos y linfáticos. Actualmente el endotelio es considerado como la capa monocelular que separa todos los tejidos de la circulación sanguínea (Minami and Aird 2005; Gori, Dragoni et al. 2007).

La estructura anatómica del endotelio es extremadamente simple y lineal, a pesar de que es un tejido muy complejo desde el punto de vista metabólico. Está formado por una monocapa de células escamosas de origen mesodérmico, la cual se origina y regenera a partir del tejido hematopoyético. En un adulto, la superficie del endotelio está compuesta por aproximadamente de $1 \text{ a } 6 \times 10^{13}$ células endoteliales, pesa aproximadamente 1 kg y cubre un área superficial de $1 \text{ a } 7 \text{ m}^2$ (Augustin, Kozian et al. 1994). Las células endoteliales son generalmente planas, pero también pueden ser cúbicas en vénulas endoteliales altas (Girard and Springer 1995; Miyasaka and Tanaka 2004) y el espesor varía de menos de $0,1 \mu\text{m}$ en los capilares y venas a $1 \mu\text{m}$ en la aorta (Florey 1966; Aird 2007).

El endotelio puede ser continuo o discontinuo. El endotelio continuo a su vez puede ser fenestrado ó no fenestrado. Las fenestraciones son poros transcelulares de aproximadamente 70 nm de diámetro que se extienden a través de todo el espesor de la célula. La mayoría de las fenestraciones poseen un fino diafragma no membranoso de 5 a 6 nm en su apertura. El endotelio continuo se caracteriza por células endoteliales fuertemente unidas unas a otras y rodeadas por una membrana basal continua. El endotelio continuo fenestrado posee fenestraciones mientras que el endotelio discontinuo se caracteriza por la presencia de separaciones francas y una membrana basal pobremente formada. El endotelio continuo no fenestrado se encuentra en arterias, venas, y capilares del cerebro, piel, corazón y pulmón. El endotelio continuo fenestrado es característico de zonas con alta filtración o transporte transendotelial como capilares de glándulas exocrinas y endocrinas, mucosa gástrica e intestinal, plexo coroideo, glomérulos y túbulos renales (Aird 2007). El endotelio discontinuo se encuentra en ciertos lechos vasculares sinusoidales, especialmente en el hígado. En contraste al endotelio fenestrado continuo, las células endoteliales sinusoidales del hígado poseen grandes fenestraciones (100 a 200 nm de diámetro) que carecen de diafragma y contienen grandes poros circulares "gaps" entre las células (Aird 2007).

La membrana de las células endoteliales está formada por una doble capa de fosfolípidos atravesada por proteínas complejas que actúan como receptores ó canales. Las células endoteliales poseen varias proteínas contráctiles como la actina, miosina, y tropomiosina. Algunas de estas proteínas están organizadas en una red cortical que rodea la superficie interna de la membrana y definen la forma y elasticidad de las células endoteliales. Las uniones asociadas a los filamentos de actina, definidas como sistema FAU, se localizan a nivel intercelular y su contracción y relajación controlan la dimensión y por lo tanto la forma del espacio intercelular, modulando el paso de solutos y macromoléculas entre la sangre y el espacio subendotelial. El sistema FAU está relacionado con las moléculas de adhesión intercelular, especialmente con la cadherina vascular endotelial, manteniendo un balance entre fuerzas adhesivas y contráctiles (Esper, Nordaby et al. 2006).

Las células endoteliales poseen tres superficies: cohesiva, adhesiva y luminal. La superficie cohesiva es la situada entre las células endoteliales y facilita los procesos de transporte y consta de uniones intercelulares especializadas: uniones gap (en hendidura), tight (estrechas),

o de adherencia (Dejana, Corada et al. 1995; Pasyk and Jakobczak 2004). La unión estrecha está formada por la proteína de membrana ocludina que establece uniones transmembrana con proteínas del citoesqueleto de las células endoteliales, permite una estrecha e intensa unión entre ellas y su principal función es evitar la separación de las células endoteliales ante el estrés hemodinámico. La unión "gap" o tipo hendidura está constituida por la proteína conexina que forma estructuras tipo canal, favorece la comunicación directa de la luz vascular con el citoplasma de las células endoteliales y de estas con otras células, por ejemplo musculares lisas o leucocitos. Su principal función es permitir el intercambio moléculas de bajo peso molecular como iones y segundos mensajeros. La unión de adherencia formada por la proteína cadherina, promueve la adhesión entre las células endoteliales. Permite mantener cohesión y comunicación entre las células endoteliales y limitar la migración no fisiológica de elementos celulares desde la luz vascular hacia los tejidos (Morales Villegas 2011). La superficie adhesiva de las células endoteliales se une a la lámina basal y finalmente la superficie luminal del endotelio vascular está revestida por una capa de macromoléculas (proteínas, glucolípidos, glucoproteínas, y proteoglucanos) denominada glicocáliz que regula el tráfico de las moléculas sanguíneas circulantes (Pasyk and Jakobczak 2004).

Las células endoteliales y su núcleo están alineadas en dirección del flujo sanguíneo en los segmentos rectos de las arterias, pero no en los puntos de ramificación (Passerini, Polacek et al. 2004; Lupu, Westmuckett et al. 2005; Aird 2007). Cuando el flujo sanguíneo aumenta y también la tensión de cizallamiento (shear stress), las células endoteliales se aplanan y se alinean en dirección del flujo, mientras que cuando el flujo disminuye las células endoteliales aumentan su volumen y pierden su alineación (Esper, Nordaby et al. 2006). Las células endoteliales son sensibles a los cambios de tensión intravascular y pueden aumentar su rigidez después de un incremento de la presión intravascular.

1.2-Funciones del endotelio

Las células endoteliales responden a los estímulos físicos (shear stress, estiramiento y presión), estímulos químicos (pH), mediadores (sustancias liberadas por el sistema nervioso autónomo, hormonas, autacoides, citoquinas) sintetizando y liberando factores moduladores del tono vascular, permeabilidad vascular, angiogénesis, remodelación vascular, respuesta inflamatoria, y hemostasia (Barac, Campia et al. 2007).

I. Regulación del tono vascular

La mantención del tono vascular depende del equilibrio entre la acción de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras, que actúan sobre las células musculares lisas de la pared vascular. El endotelio juega aquí un importante papel, produciendo ambos tipos de sustancias. La alteración del equilibrio vasodilatación/vasoconstricción representaría un evento inicial en el desarrollo de la disfunción endotelial.

- Factores vasodilatadores derivados del endotelio:

Óxido nítrico (NO)

El NO se genera a través de la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina mediante el enzima NO sintasa (NOS) (Palmer, Ashton et al.). Se conocen 3 isoformas de NOS: NOS-I, NOS-II, NOS-III. La NOS-I o neuronal se encuentra predominantemente en el sistema nervioso. La NOS-II o iNOS se encuentra en macrófagos, neutrófilos y otras células inflamatorias. La NOS-III o eNOS se encuentra en células endoteliales, miocitos cardíacos, osteoclastos, osteoblastos y en células mesangiales renales en menor grado (Forstermann and Munzel 2006). La activación de la eNOS depende de la concentración intracelular de Ca^{+2} y además es calcio-calmodulin dependiente. Además su activación requiere de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y tetrahidrobiopterina como cofactores (Vanhoutte 2003). El NO puede ser sintetizado por las células endoteliales en respuesta a estímulos fisiológicos como la

tensión de cizallamiento (shear stress) ó estímulos químicos como la acetilcolina, ácido araquidónico y la 5-hidroxitriptamina (Pohl, Holtz et al. 1986; Vanhoutte 2003). Estas sustancias pueden liberar NO mediante la activación de receptores de membrana específicos de las células endoteliales (Celermajer 1997). La tensión de cizallamiento induce activación de la eNOS mediada por la fosforilación inducida por la serina/treonina proteína kinasa Akt/PKB (Dimmeler, Fleming et al. 1999). El NO difunde de la célula endotelial y puede afectar al músculo liso vascular mediante la activación de la guanilato ciclasa después de unirse al grupo hemo del enzima (Al-Sa'doni and Ferro 2000). La activación de esta enzima da lugar a un incremento de la producción de guanosín monofosfato cíclico (GMPc), activación de la protein kinasa dependiente de GMPc y fosforilación de los canales de K^+ conduciendo a hiperpolarización y reducción de la concentración intracelular de Ca^{+2} (Lincoln, Komalavilas et al. 1994). Ese proceso resulta en la relajación de las células del músculo liso. Hay dos protein kinasas dependientes de GMPc (I y II), la tipo I media la vasodilatación y la inhibición de la agregación plaquetaria (Pfeifer, Klatt et al. 1998; Massberg, Sausbier et al. 1999). La actividad del GMPc termina con su conversión en GMP por fosfodiesterasas. El NO está implicado en la regulación la presión sanguínea y del tono vascular. La inhibición de la NOS causa vasoconstricción en la mayoría de los lechos vasculares e incrementa la presión sanguínea (Moncada, Palmer et al. 1991). El NO también participa en la homeostasis inmunológica vascular, es liberado hacia las células musculares lisas y hacia el lumen vascular. En muchos procesos patológicos como la diabetes, shock, inflamación, infarto e inflamación crónica se produce una incapacidad para sintetizar NO (Gross and Wolin 1995). El NO inhibe la adhesión y agregación plaquetaria y promueve la desagregación a través de un mecanismo dependiente de GMPc (Mendelsohn, O'Neill et al. 1990). El NO también inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio (Kubes, Suzuki et al. 1991) y la migración y proliferación de células musculares lisas (Garg and Hassid 1989; Marks, Vita et al. 1995). Estos efectos biológicos hacen que el NO sea un componente importante de la prevención endógena de lesiones vasculares, inflamación y trombosis (eventos implicados en el proceso aterosclerótico) (Behrendt and Ganz 2002).

Prostaciclina (PGI₂)

Otro importante vasodilatador derivado del endotelio es la PGI₂ que fue descrita por primera vez en 1979 (Stankevicius, Kevelaitis et al. 2003) y se forma principalmente en células endoteliales a partir de ácido araquidónico a través de la ciclooxigenasa (Gryglewski 1983). La ciclooxigenasa-1 (COX-1) se expresa constitutivamente en células endoteliales y es la principal isoforma implicada en la producción de PGI₂ (Gryglewski 1979). La fosfolipasa A₂, la cual convierte los fosfolípidos de membrana en ácido araquidónico es el paso limitante en la síntesis de PGI₂. La síntesis de PGI₂ es un proceso Ca^{+2} dependiente debido a que la fosfolipasa A₂ es Ca^{+2} sensible (Chang, Musser et al. 1987). La PGI₂ activa el receptor de prostaciclina (IP) (acoplado a proteína G) (Coleman, Smith et al. 1994) y causa relajación del músculo liso vascular a través de la estimulación de la adenilato ciclasa e incrementa los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Celermajer 1997). La activación de la protein kinasa A disminuye la actividad quinasa de la cadena ligera de miosina conduciendo a la vasodilatación. La PGI₂ también puede difundir a la sangre e inhibir la agregación plaquetaria (Radomski, Palmer et al. 1987). La acción de la PGI₂ está estrechamente relacionada con los efectos del NO ya que la PGI₂ potencia su liberación y el NO potencia el efecto de la PGI₂ sobre las células musculares lisas vasculares. El NO inhibe la fosfodiesterasa (enzima que degrada el AMPc) (Stankevicius, Kevelaitis et al. 2003). Por lo tanto el aumento de AMPc prolonga los efectos de la PGI₂ sobre las células musculares lisas.

Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

En 1988, Taylor y Weston describieron un agente vasodilatador derivado del endotelio que era diferente del NO y de la PGI₂. Producía vasodilatación por hiperpolarización de las células musculares lisas vasculares en presencia de inhibidores de la NOS y de la COX (Taylor and Weston 1988). En contraste, inhibidores de la ATPasa Na^+/K^+ o la despolarización de las células del músculo liso con elevadas concentraciones de K^+ extracelular impiden la vasodilatación arterial. Se propone que el EDHF ejerce su efecto por aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular, que provoca la apertura de los canales de K^+ sensibles al

Ca^{+2} produciéndose relajación de las células del músculo liso vascular (Nelson, Huang et al. 1990).

Ácidos epoxieicoxatrienoicos (EETs)

Los metabolitos del ácido araquidónico producidos por el citocromo P-450 pueden difundir de la célula endotelial al músculo liso y actuar como el EDHF (Fisslthaler, Popp et al. 1999; Quilley and McGiff 2000).

Uniones gap

Algunos estudios proponen que las uniones gap mioendoteliales pueden mediar vasodilatación endotelial asociada con la hiperpolarización de las células musculares. Las uniones gap pueden facilitar el acoplamiento eléctrico entre las células endoteliales y las células musculares lisas y causan un acoplamiento bidireccional entre estas células (Emerson and Segal 2000). Por lo tanto la hiperpolarización inducida en las células endoteliales causa relajación de las células musculares lisas y la denudación del endotelio altera esta respuesta (Emerson and Segal 2001).

Especies reactivas de oxígeno y peróxido de hidrógeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas derivadas de oxígeno; las más importantes son el superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxil (OH^{\cdot}). La generación de ROS ocurre bajo condiciones fisiológicas normales, no está restringida a condiciones patológicas. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la transformación del superóxido en H_2O_2 . Hay varias isoformas: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD o mitocondrial, y Fe-SOD que se localiza en las células endoteliales (Inoue, Watanabe et al. 1991). Además la catalasa o glutathion peroxidasa también metaboliza el H_2O_2 en agua. El balance entre procesos oxidantes y antioxidantes regula la cantidad de ROS generadas por las células endoteliales y un desequilibrio entre estos dos procesos va a deteriorar la función endotelial. El anión superóxido reacciona con el NO y forma peroxinitrito (ONOO^-) (Beckman, Beckman et al. 1990) que altera la función endotelial. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que la ROS H_2O_2 tiene un efecto relajante directo (Wei, Kontos et al. 1996; Barlow, El-Mowafy et al. 2000). Los radicales de oxígeno se forman en las células endoteliales en respuesta a incrementos en la presión sanguínea y a activación por agonistas endoteliales (Stankevicius, Kevelaitis et al. 2003). Las ROS secretadas por las células endoteliales generadas por las enzimas NADPH oxidasa y la xantina oxidoreductasa desacoplan la NO sintasa y el citocromo P450. Hay numerosos estudios que demuestran que las ROS tienen efectos relajantes en las células musculares lisas vasculares (Ellis and Triggle 2003). El peróxido de hidrógeno se forma a partir del superóxido por la superóxido dismutasa. Algunos estudios demostraron que el peróxido de hidrógeno actúa como el EDHF. La relajación mediada por las ROS se asume que puede estar directa o indirectamente relacionada con la activación de los canales de potasio. El H_2O_2 puede alterar muchos de los mecanismos de transporte relacionados con el calcio intracelular, resultando en una elevación de la concentración intracelular de Ca^{+2} en las células endoteliales (Kimura, Maeda et al. 1992). Este incremento del Ca^{+2} citosólico puede ser suficiente para abrir los canales de potasio activados por Ca^{+2} , provocando una respuesta vasodilatadora (Barlow and White 1998).

- Factores vasoconstrictores derivados del endotelio:

Endotelina-1 (ET-1)

La ET-1 se sintetiza en varios tipos de células, incluyendo las células endoteliales. Hay tres tipos de ET, pero las células endoteliales producen solo ET-1 (Inoue, Yanagisawa et al. 1989). El precursor de ET-1 es la preproendotelina-1. La escisión de la preproendotelina-1 por endopeptidasas genera proendotelina-1 (Big-ET-1), la cual es convertida en ET-1 por la enzima convertidora de ET-1 (Brown, Barnes et al. 2000). La ET-1 es un potente vasoconstrictor (Herrmann and Lerman 2001), y debido a su corta vida media (Anggard, Galton et al. 1989), este péptido actúa principalmente como un vasoregulator local. La ET-1 es liberada en respuesta a estímulos como la hipoxia, adrenalina (Boulanger and Luscher 1990), shear stress e isquemia (Cines, Pollak et al. 1998). Se une a dos tipos de receptores acoplados a proteínas

G, el receptor ET_A , que está localizado en las células musculares lisas vasculares y media efectos vasoconstrictores y mitogénicos, y el receptor ET_B , localizado en las células endoteliales y que media vasodilatación por activación de la producción de NO y de PGI_2 (Boulanger and Luscher 1990; Herrmann and Lerman 2001).

El efecto vasoconstrictor de la ET-1 está asociado con el incremento de la concentración de Ca^{+2} en los miocitos vasculares. Cuando la ET-1 se une al receptor ET_A acoplado a proteína G, causa activación de la fosfolipasa C, que transforma el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en inositol1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 libera Ca^{+2} de los almacenes intracelulares y el DAG aumenta el flujo de entrada de Ca^{+2} desde el exterior celular (Pernow, Kaijser et al. 1996; Kiely, Cargill et al. 1997).

El efecto vasodilatador de la ET-1 está mediado por el receptor ET_B localizado en la superficie de las células endoteliales. La activación del receptor ET_B provoca la activación de la fosfolipasa A_2 citosólica y la síntesis de otros factores derivados del endotelio como PGI_2 (Molnar and Hertelendy 1995). Además el receptor ET_B también modula la formación de NO teniendo así un efecto protector contra la vasoconstricción excesiva (Giardina, Green et al. 2001).

Prostaglandinas vasoconstrictoras

Las células endoteliales liberan prostaglandina H_2 (PGH_2) y tromboxano A_2 (TXA_2) como factores de contracción derivados del endotelio. La PGH_2 , que deriva del ácido araquidónico, es el precursor de todos los prostanoides incluyendo el TXA_2 (Stankevicius, Kevelaitis et al. 2003). El ácido araquidónico se libera de los fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A_2 . La COX-1 y COX-2 convierten el ácido araquidónico en PGH_2 , la cual es convertida en TXA_2 por la acción de la TX sintasa. La PGH_2 y el TXA_2 provocan vasoconstricción reduciendo las concentraciones intracelulares de AMPc en las células musculares lisas vasculares (Halushka, Mais et al. 1989) y/o incrementando los niveles de Ca^{+2} citosólico (Smith, Coleman et al. 1994).

20-hidroxicicosatetraenoico (20-HETE)

Uno de los principales metabolitos del ácido araquidónico es el 20-hidroxicicosatetraenoico (20-HETE). Algunas evidencias sugieren que el 20-HETE tiene un papel central en la regulación de la función vascular pulmonar y renal (Makita, Falck et al. 1996; McGiff and Quilley 1999; Gebremedhin, Lange et al. 2000). La elevación de Ca^{+2} citoplasmático activa la fosfolipasa A_2 , la cual convierte el ácido araquidónico en 20-HETE. El 20-HETE inhibe los canales K_{Ca} en las células musculares lisas vasculares promoviendo la despolarización de la membrana, la entrada de Ca^{+2} y la vasoconstricción (Gebremedhin, Lange et al. 2000). El bloqueo de su formación afecta a la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral y elimina la presión inducida por la constricción en las arterias cerebrales (Gebremedhin, Lange et al. 2000).

II. Hemostasia

La hemostasia está mediada por un balance de factores procoagulantes y anticoagulantes. Bajo condiciones normales hay un balance entre las propiedades protrombóticas y antitrombóticas del endotelio. La alteración de la función endotelial por varios estímulos puede contribuir a la pérdida del estado antitrombótico de las células endoteliales conduciendo a varias patologías. El endotelio sintetiza trombomodulina, una glicoproteína que se sitúa en la cara luminal del endotelio y actúa como receptor endotelial de la trombina. La trombina al unirse a la trombomodulina pierde su capacidad hemostática y activa la proteína C, que a su vez inhibe los factores de coagulación V y VIII (Walker, Sexton et al. 1979). Además la unión de la trombomodulina a la trombina previene la formación de fibrina y la activación plaquetaria por la trombina (Gross and Aird 2000). El endotelio también produce proteína S, un cofactor de la proteína C, reforzando así su acción anticoagulante. El EDHF contribuye a mantener la carga electronegativa de la superficie endotelial gracias a la cual se previene el depósito de las plaquetas activadas. Las nucleotidasas producidas en las células endoteliales degradan rápidamente el ADP producido por las plaquetas activadas que estimula la activación y la

agregación plaquetaria (González 1997; Drexler 1998). En presencia de un endotelio normal, las plaquetas circulan sin adherirse a la pared vascular. La producción de PGI_2 y NO son importantes para la prevención de la adhesión y agregación plaquetaria (Mendelsohn, O'Neill et al. 1990) a través de un incremento en AMPc y GMPc en el citoplasma de las plaquetas respectivamente.

Cuando el endotelio sufre una lesión, esta actividad anticoagulante y antiplaquetaria disminuye, y aumenta la expresión de moléculas que llevan a la activación plaquetaria y la activación de la cascada de la coagulación para reparar el daño vascular. El factor de vonWillebrand (vWF) se expresa en la superficie de las células endoteliales e interacciona con las plaquetas iniciando la adhesión y agregación plaquetaria. También aumenta la expresión del factor tisular y del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) que desencadenan la activación de la cascada de la coagulación (Mendelsohn, O'Neill et al. 1990; Aird 2005; Verhamme and Hoylaerts 2006).

III. Inflamación y respuesta inmune

Las células endoteliales producen numerosos mediadores inflamatorios, expresan moléculas de adhesión celular y también sufren algunos cambios morfológicos durante la inflamación. Por lo tanto, estas células pueden ser blanco de mediadores inflamatorios y leucocitos durante la inflamación. La inflamación sistémica puede inducir una respuesta inflamatoria por parte de las células endoteliales. Dicha respuesta puede ser causada por factores de riesgo como la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial, el tabaco, la diabetes, etc. La adhesión de leucocitos al endotelio es un evento clave en la inflamación y resulta en la migración leucocitaria *trans*-endotelial hacia los sitios de inflamación (Carlos and Harlan 1994). El endotelio estimulado por las citocinas expresa glicoproteínas de adhesión en su superficie (Ross 1993), y aumenta la expresión de moléculas de adhesión, facilitando el reclutamiento de células inmunes de la sangre hacia los tejidos. Las células endoteliales activadas también pueden producir citocinas como las interleucinas (IL) IL-1 o IL-6, y poderosos mediadores vasoactivos como el factor activador plaquetario, que potencian las respuestas inmunes e inflamatorias. Las glicoproteínas adhesivas son miembros de la familia de las selectinas (selectina E y selectina P) y de la superfamilia de las inmunoglobulinas (molécula 1 de adhesión de plaquetas a células endoteliales o *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1) (Albelda, Smith et al. 1994). Cuando dichas glicoproteínas se expresan en la superficie de las células endoteliales son reconocidas por integrinas presentes en la superficie de los leucocitos, se unen a la superficie endotelial y migran hacia el interior de la pared vascular a través de las uniones entre células endoteliales. Este proceso se ve influido por moléculas reguladoras del crecimiento y sustancias quimioatrayentes liberadas tanto por las células endoteliales como por los leucocitos adheridos, por ejemplo, interleucinas (IL-8) (Matsushima and Oppenheim 1989), leucotrienos, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) o PECAM-1. La MCP-1, además de inducir la liberación de histamina y leucotrienos como la IL-8 (Taub and Oppenheim 1993), atrae a linfocitos CD4^+ y CD8^+ hacia el lugar de inflamación, y puede estimular la liberación de citocinas inflamatorias como IL-1 y IL-6 a partir de los monocitos.

El endotelio también sufre cambios morfológicos durante la inflamación que conducen al incremento de la permeabilidad vascular y filtraciones. Las filtraciones vasculares son producto de la contracción y retracción de las células endoteliales. Adicionalmente, las células endoteliales liberan los vasodilatadores NO y PGI_2 . La vasodilatación incrementa la permeabilidad vascular de manera indirecta. Los leucocitos interactúan con la pared vascular y los anticuerpos anti-células endoteliales producen daño endotelial y un aumento en la permeabilidad vascular. Los mediadores de este proceso son intermediarios reactivos del oxígeno y algunas metaloproteinasas de la matriz extracelular (Varani, Ginsburg et al. 1989).

IV. Permeabilidad endotelial

El endotelio forma una barrera semipermeable entre la sangre y los tejidos circundantes. El control de la transferencia de solutos y macromoléculas dentro y fuera de la sangre a través de la pared de los vasos sanguíneos es otra función importante del endotelio. La función barrera depende de la integridad de la estructura endotelial, dicha estructura se ve afectada por cambios en el citoesqueleto, en los complejos de unión célula-célula y el acoplamiento de células a la matriz extracelular y a la membrana basal. Una regulación adecuada de estas estructuras y eventos mantiene una baja permeabilidad selectiva para fluidos y solutos en condiciones fisiológicas normales.

La disfunción de la barrera endotelial se produce durante la estimulación por agentes inflamatorios, patógenos, células sanguíneas activadas o estados de enfermedad, y se caracteriza por el flujo excesivo de plasma a través de la pared endotelial de los tejidos circundantes (Komarova and Malik 2010).

La permeabilidad se puede diferenciar en permeabilidad basal, la cual se produce a nivel de los capilares, el principal lugar de intercambio vascular, y permeabilidad inducida asociada con la inflamación, que implica predominantemente vénulas post-capilares. Mientras que los fluidos y solutos pequeños, se mueven pasivamente utilizando la ruta paracelular, las macromoléculas utilizan la vía transcelular movilizándose a través de portadores vesiculares de membrana como las caveolas o a través de un grupo de vesículas vacuolares (VVOs, vesicle-vacuolar organelle) interconectadas, que forman una estructura de canal de 80 a 200 nm de diámetro que atraviesa el interior celular. El transporte transcelular de macromoléculas puede ser dependiente de receptor (transcitosis mediada por receptor) como ocurre por ejemplo en el caso de la albúmina, o independiente (transcitosis en fase fluida) (Minshall and Malik 2006; Aird 2007; Yuan and Rigor 2010).

- Vía transcelular.

La ruta transcelular o transcitosis, permite el paso de macromoléculas, como las proteínas plasmáticas, a través del endotelio. Este proceso es esencial para el transporte de la albúmina, de ligandos unidos a albúmina y de hormonas, así como para regular la presión oncótica en el endotelio (Komarova and Malik 2010). En el endotelio existen mecanismos de transcitosis específicos que facilitan el paso de macromoléculas del torrente sanguíneo a través de las células endoteliales hacia el espacio subendotelial, para cubrir las necesidades metabólicas de las células del tejido circundante. Las células endoteliales expresan los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4, siendo GLUT-1 la isoforma más abundante. La regulación de la expresión del GLUT-4 es un proceso esencial en la regulación del transporte de glucosa y es particularmente importante en la diabetes y la hipoxemia (Mann, Yudilevich et al. 2003). El endotelio también posee múltiples sistemas de transporte para aminoácidos, siendo el sistema transportador de aminoácidos catiónicos el más importante ya que se usa para el transporte de L-arginina, sustrato para la síntesis de NO. Este transporte de L-arginina puede ser estimulado por citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), lo que supone un incremento de la producción de NO (Bogle, MacAllister et al. 1995).

El transporte transcelular implica caveolas de membrana y citosólicas que migran a través de las células endoteliales capilares y transportan macromoléculas desde la sangre al intersticio. El mecanismo por el que se produce consiste en una endocitosis, seguida de transcitosis a través de la célula y exocitosis en la membrana basolateral. La endocitosis y la exocitosis son mediadas por las caveolas las cuales, mediante la formación de vesículas, son capaces de transportar fluidos y solutos a través del interior celular (Yuan and Rigor 2010).

Las caveolas son microdominios de membrana ricos en colesterol y glucoesfingolípidos recubiertos en la superficie citoplasmática con la proteína caveolina-1 (Rothberg, Heuser et al. 1992). Son componentes estructurales característicos de las células endoteliales y pueden constituir hasta el 15% de su volumen. Numerosas moléculas de señalización, como las proteínas G, quinasas, eNOS o canales iónicos se asocian con la caveolina-1 (García-Cardena, Fan et al. 1996; Lockwich, Liu et al. 2000; Absi, Burnham et al. 2007). Por lo tanto, la caveolina-1, a través de la regulación de las interacciones proteína-proteína, concentra moléculas de

señalización y optimiza sus funciones (Minshall and Malik 2006). El evento de señalización clave en la regulación de la transcitosis es la fosforilación dependiente de Src de la tirosina de la caveolina-1 que inicia la fisión de la vesícula unida a la membrana y a continuación se produce la endocitosis, la trans migración de la vesícula a través del interior celular a la cara basolateral (transocitosis), probablemente mediante interacciones con los microtúbulos (Liu, Magnusson et al. 1993; Minshall and Malik 2006; Yuan and Rigor 2010). Al llegar a la membrana diana, las vesículas se unen a proteínas de acoplamiento y se fusionan con la membrana basolateral o con VVOs en el interior de la célula. Una vez se fusionan tanto a VVOs o a la membrana basolateral, las vesículas pueden realizar la exocitosis, liberando su contenido al tejido circundante (Predescu, Predescu et al. 2007). Sin embargo, todavía se desconoce qué solutos son depositados por las vesículas en las VVOs y en qué medida esto contribuye a la permeabilidad basal o estimulada para cualquier soluto en particular (Dvorak, Brown et al. 1995; Yuan and Rigor 2010).

Además, existe un mecanismo alternativo para facilitar el paso transcelular de fluido a través de canales transmembrana de agua denominados acuaporinas (Levick and Michel 2010). Las acuaporinas son proteínas integrales de membrana expresadas en las células endoteliales que permiten el flujo difusivo de agua a través de la membrana celular. Sin embargo, en muchos tejidos se cree que la contribución de las acuaporinas al paso de solutos y macromoléculas es menor o insignificante (Renkin and Curry 1978).

Cuando se compara con el endotelio continuo, la permeabilidad en el endotelio fenestrado al agua y solutos pequeños está aumentada pero el transporte transcelular de macromoléculas es similar. En el endotelio discontinuo sinusoidal, pequeños solutos, agua y macromoléculas difunden a través de las uniones gaps. Estas células endoteliales poseen clatrina revistiendo la unión gap, lo que puede contribuir a la transcitosis (Aird 2007).

- Vía paracelular

La vía paracelular es responsable de la filtración de fluido sanguíneo y proteínas a través del endotelio microvascular en condiciones fisiopatológicas. En los microvasos de ciertos órganos como el riñón y el hígado, entre las células endoteliales hay discontinuidades o fenestraciones que son suficientemente grandes para permitir el paso de grandes moléculas o proteínas (Michel and Curry 1999). En otros órganos, las células endoteliales se fusionan entre sí mediante uniones intercelulares o poros que permiten selectivamente el paso de agua, macromoléculas, y células sanguíneas a su través. La integridad estructural y funcional de estas uniones es determinante para la permeabilidad paracelular. Las uniones de adherencia y estrechas actúan como estructuras barrera en el endotelio (Mehta and Malik 2006; Komarova and Malik 2010). Las uniones de adherencia se encuentran en casi toda la microvasculatura, son impermeables a la albúmina y grandes proteínas, y por lo tanto actúan como una barrera a macromoléculas en muchos órganos y tejidos (Simionescu, Simionescu et al. 1978; Mehta and Malik 2006). Sin embargo, las uniones estrechas son menos comunes en la microvasculatura, expresándose en algunos tejidos especializados como en el cerebro ó la retina (Hawkins and Davis 2005). Impiden el paso de moléculas mucho más pequeñas y restringen el paso de iones.

Las propiedades de barrera de las uniones de adherencia y estrechas son debidas a las interacciones de las glicoproteínas integrales de membrana entre células endoteliales vecinas. Los dominios extracelulares de las proteínas de unión presentes en la superficie de las células endoteliales se unen entre si y forman un sello, restringiendo el paso de moléculas entre las células (paracelular).

Sin embargo las uniones gap, las fenestraciones y el endotelio discontinuo no se consideran determinantes de la permeabilidad paracelular. Las uniones gap están constituidas por seis unidades de conexina que forman un canal que conecta el citosol de células endoteliales vecinas, lo que permite la rápida propagación de moléculas de señalización (por ejemplo, Ca^{+2}) entre las células (Koval and Battacharya 2006). Así, aunque las uniones comunicantes pueden participar indirectamente en la regulación de la permeabilidad endotelial promoviendo la

comunicación célula-célula, no proporcionan función de barrera per se. El endotelio de algunos tejidos como el riñón, el intestino o el plexo coroideo posee fenestraciones de 50-60 nm de diámetro. Otros tejidos, como el hígado o el bazo, poseen un endotelio discontinuo con huecos de 100 nm que permiten el paso de grandes solutos (Levick 2010). Este tipo de uniones son estructuras especializadas en tejidos responsables de la absorción de nutrientes, la desintoxicación y la eliminación de desechos tóxicos.

En el endotelio en condiciones basales, las uniones entre las células endoteliales son impermeables a las macromoléculas. Las uniones estrechas y de adherencia interactúan con el citoesqueleto de actina endotelial y establecen una barrera restrictiva a las macromoléculas. Sin embargo, en la inflamación aguda o crónica, la isquemia-reperfusión, la aterosclerosis, la sepsis, la diabetes, la lesión térmica, la angiogénesis tumoral o la metástasis, los mediadores como histamina, serotonina, trombina, bradiquinina, sustancia P, factor activador de plaquetas (PAF), citoquinas, factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y ROS inducen retracción de las células endoteliales, lo que aumenta el espacio intercelular y por consiguiente la permeabilidad a solutos y proteínas plasmáticas. Las alteraciones de la función de barrera endotelial conducen a una anormal extravasación de líquido y macromoléculas, lo que conlleva formación de edema y disfunción tisular. Éste, es el primer paso que ocurre en la inflamación no sólo a nivel de las vénulas post-capilares, sino también en respuesta a VEGF a nivel de arteriolas y capilares (Feletou, Bonnardel et al. 1996; van Hinsbergh 1997; Michel and Curry 1999; Feletou, Stacek et al. 2001; Feletou, Boulanger et al. 2003). El edema se desarrolla cuando la extravasación de plasma excede a su reabsorción y a la capacidad del sistema linfático para eliminar los fluidos del espacio intersticial.

La integridad de la barrera endotelial es determinada no sólo por las fuerzas de unión que acoplan las células endoteliales unas a otras y a la matriz extracelular, sino también por la forma de las células endoteliales. La activación de la actina-miosina regula la función contráctil de las células endoteliales, este proceso es activado por mediadores inflamatorios. La tracción ejercida puede interferir con las uniones celulares provocando la retracción de las células endoteliales (Sandoval, Malik et al. 2001; Minshall and Malik 2006). Este es un proceso dinámico y reversible (Feletou, Bonnardel et al. 1996; Feletou, Stacek et al. 2001).

Las uniones adherentes se han identificado en casi todos los tipos de lechos vasculares, especialmente en la microvasculatura periférica. La cadherina vascular endotelial (VE-cadherina) es la principal proteína estructural de las uniones adherentes, es un receptor transmembrana. Su dominio extracelular se une al dominio extracelular de otra VE-cadherina de la célula endotelial adyacente mediante la formación de un enlace homotípico. La unión intermolecular de los dominios extracelulares de VE-cadherina es dependiente del Ca^{+2} extracelular. El Ca^{+2} se une la carga negativa de los residuos de aminoácidos en el dominio extracelular de la VE-cadherina promoviendo la conformación necesaria para que la VE-cadherina lleve a cabo la unión homotípica (Rudini and Dejana 2008). Intracelularmente, la VE-cadherina está conectada al citoesqueleto de actina a través de las cateninas (α , β , γ y p-120 cateninas). La VE-cadherina se une directamente a β -catenina y γ -catenina, las cuales se conectan con la actina a través de la α -catenina. La conexión con el citoesqueleto de actina se estabiliza por la unión de otras proteínas como α -actinina, vinculina, y p-120 catenina. La estabilidad de la VE-cadherina-catenina-citoesqueleto es esencial para el mantenimiento de la función de la barrera endotelial (Vincent, Xiao et al. 2004; Sallee, Wittchen et al. 2006).

Además de la VE-cadherina y cateninas, en las uniones intercelulares están presentes otras proteínas que se pueden asociar o interactuar con las uniones adherentes, como la E-cadherina, moléculas de unión adhesión (JAM), y la molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial (PECAM-1). La contribución específica de estas proteínas endoteliales a las propiedades barrera no está clara. Las JAM pueden unirse a la *zona ocludens* 1 (ZO-1), una proteína que conecta las proteínas de las uniones estrechas a la α -catenina, a moléculas de señalización y a proteínas que estabilizan el citoesqueleto de actina. La PECAM-1 se une a las

integrinas en leucocitos y puede facilitar la trans migración de leucocitos a través del endotelio microvascular.

Las uniones estrechas endoteliales son similares a las adherentes, pero se componen de interacciones de las proteínas de uniones estrechas: ocludina, claudina y JAM-A (Hawkins and Davis 2005; Mehta and Malik 2006). La ocludina y claudina son proteínas integrales de membrana con cuatro dominios transmembrana y dos dominios extracelulares. Los dominios extracelulares forman una unión homotípica con los dominios extracelulares de células endoteliales adyacentes. JAM-A pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Es una proteína transmembrana que también forma interacciones homotípicas entre células endoteliales vecinas. La ocludina, claudina y JAM-A están conectadas al citoesqueleto de actina a través de la proteína *zona occludens* (ZO-1, ZO-2) y α -catenina. Además de conectar las proteínas de unión al citoesqueleto, las proteínas ZO actúan como moléculas de señalización en las uniones estrechas (Hawkins and Davis 2005; Shen, Wu et al. 2009).

Las adhesiones focales son puntos de unión entre la membrana basolateral del endotelio y la matriz extracelular (MEC) circundante de la pared vascular (Wu 2005). Sus principales componentes estructurales son los receptores transmembrana denominados integrinas. Las integrinas son una familia de glicoproteínas expresadas como heterodímeros α / β , cuyo dominio intracelular interactúa con el citoesqueleto, ya sea directa o indirectamente a través de proteínas de enlace (paxilina, talina, vinculina o α -actinina). Su dominio extracelular se une a proteínas de la matriz, tales como fibronectina, vitronectina, colágeno, fibrinógeno o laminina. La organización molecular de las integrinas varía dependiendo del estado químico y físico de las matrices extracelulares (Yuan and Rigor 2010). La unión de las integrinas a la matriz extracelular es esencial para el establecimiento y la estabilización de las barreras endoteliales (del Zoppo and Milner 2006). Las adhesiones focales ayudan a mantener las propiedades fisiológicas normales de la barrera endotelial, su ensamblaje y actividad. Además, median las respuestas de hiperpermeabilidad bajo condiciones de estimulación en presencia de factores angiogénicos, mediadores de la inflamación, o fuerzas físicas (Yuan and Rigor 2010). Los mecanismos precisos por los cuales las adhesiones focales contribuyen al mantenimiento de la función de barrera endotelial y las respuestas de hiperpermeabilidad ante una estimulación no se comprenden en su totalidad (Wu 2005). Se ha sugerido que varias señales químicas y físicas pueden ser detectadas y coordinadas en los contactos focales célula-matriz, en donde las integrinas desempeñan un papel fundamental en la señalización cruzada transmembrana entre las células y la MEC. En este contexto, las adhesiones focales son dominios tipo balsa lipídica que contienen proteínas estructurales que se unen a múltiples moléculas de señalización intracelulares. Por una parte, las interacciones MEC-integrina inducen señalización hacia el interior celular que puede contribuir al mantenimiento de la integridad de la barrera endotelial. Por otra parte, la unión agonista-receptor inicia eventos de señalización hacia el exterior celular que modulan las adhesiones integrina-MEC. Estas respuestas alteran la fuerza de estas interacciones y, en el peor de los casos, producen el desensamblaje de las adhesiones focales pudiendo producirse hasta la separación de células de la MEC. Las adhesiones focales alteradas también pueden interferir con el mantenimiento de la tensión normal del citoesqueleto requerida para el mantenimiento de las propiedades de la barrera basales. En respuesta a ciertos estímulos, como la histamina, tanto el número como la fuerza de las uniones integrina-matriz se ve incrementada. Esto puede contribuir a la hiperpermeabilidad a través de la transducción de fuerzas contráctiles del citoesqueleto a las uniones célula-célula produciendo la apertura la barrera endotelial (Yuan and Rigor 2010).

Hay varios factores endoteliales que pueden modular la permeabilidad endotelial, por ejemplo la inhibición de la producción basal de NO disminuye la permeabilidad a través del endotelio. El aumento de ET-1, angiotensina II y citocinas inflamatorias como el TNF e IL-1 también contribuyen a incrementar la permeabilidad a través del endotelio vascular (Toborek and Kaiser 1999).

Los mediadores inflamatorios como la trombina y la histamina incrementan la permeabilidad en cuestión de minutos. El posible mecanismo de modulación de la permeabilidad incluye la

fosforilación de proteínas implicadas en la organización de las uniones endoteliales con la consiguiente contracción actina-miosina y un incremento de la unión gap interendotelial. De este modo se producen cambios en el transporte de macromoléculas a través de las uniones endoteliales. Éste es el principal mecanismo para incrementar la permeabilidad endotelial al menos en respuesta a mediadores inflamatorios (Lum and Malik 1994; Lum and Malik 1996).

1.3-Disfunción endotelial

En condiciones normales las células endoteliales modulan la función vascular ejerciendo un tono vasodilatador, controlando el intercambio entre los compartimentos extra e intravascular, inhibiendo la activación y agregación plaquetaria, la trombogeneidad de la sangre, la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, y la proliferación y crecimiento de las células del músculo liso (Jaffe 1996; Gibbons 1997). Para que el endotelio pueda ejercer estas funciones es necesaria la integridad anatómica y funcional del mismo. En presencia de factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia, la hipertensión, la diabetes, el tabaquismo, el envejecimiento o la menopausia, se alteran drásticamente estas funciones. En estas condiciones se pierde el papel homeostático que ejerce el endotelio sobre la función vascular como consecuencia de cambios en el patrón de producción y liberación de factores vasoactivos derivados de éste; se produce una disminución de NO y un aumento de ET-1 (Kawashima and Yokoyama 2004; Sudano, Spieker et al. 2006; Sudano, Virdis et al. 2007). Esta situación de desequilibrio se denomina disfunción endotelial (Haynes and Webb 1998; Mombouli and Vanhoutte 1999) y se manifiesta con una predisposición de las paredes vasculares a una reducción de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio, una mayor respuesta vasoconstrictora, adhesión de leucocitos, activación de plaquetas, estrés oxidativo, trombosis, coagulación, inflamación y a un incremento de la permeabilidad vascular que puede facilitar el desarrollo de aterosclerosis (Badimon, Badimon et al. 1992; Badimon and Martinez-Gonzalez 2002; Verma and Anderson 2002; Badimón and Martínez-González 2003; Verma, Buchanan et al. 2003; Badimon, Martinez-Gonzalez et al. 2006). La disfunción endotelial está asociada a un gran número de patologías, como por ejemplo diabetes (Avogaro, Albiero et al. 2011), hipertensión arterial (Li, Zhao et al. 1997), hipercolesterolemia (de las Heras, Cediell et al. 2003), aterosclerosis (Vanhoutte 1991) e insuficiencia cardíaca (Kubo, Rector et al. 1991; Buikema, van Gilst et al. 1993).

La disfunción endotelial se produce como consecuencia de la respuesta compensatoria del endotelio vascular a las agresiones provocadas por diferentes factores aterogénicos (flujo sanguíneo turbulento, hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, tóxicos como el tabaco, microorganismos como la *Chlamydia pneumoniae*, inmunocomplejos) (Gimbrone, Nagel et al. 1997). Estos factores producen un daño endotelial que conduce a la disfunción y muerte celular por apoptosis (Shi, Haberland et al. 2000). Independientemente del agente nocivo, el endotelio responderá en primer lugar con un aumento de permeabilidad y la producción de moléculas de adhesión vascular (Johnson-Tidey, McGregor et al. 1994).

1.4-Aterosclerosis

Las complicaciones de la aterosclerosis son la principal causa de muerte en las sociedades occidentales (Glass and Witztum 2001). Arteriosclerosis es un término genérico que se refiere al engrosamiento y al endurecimiento de las arterias, independientemente de su tamaño. Cuando afecta a las arterias de mediano y gran calibre se denomina aterosclerosis. La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares y se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de la elasticidad. Su lesión básica es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias y pasa por diferentes estadios (Stary, Chandler et al. 1995). Generalmente se complica mediante la fisura, la erosión o la rotura de la placa y la formación de un trombo en su superficie, lo que facilita su crecimiento y la aparición de isquemia o necrosis. Este hecho

causa parte de sus manifestaciones clínicas. Se trata de una enfermedad sistémica que afecta a arterias de diferentes localizaciones simultáneamente pero con diferente grado de progresión. Tiende a asentarse en las arterias que irrigan el corazón (coronarias), el cerebro (carótidas, vertebrales y cerebrales) y las extremidades inferiores (ilíacas y femorales). Por lo tanto, la presencia de afectación vascular en una localización concreta se asocia con un mayor riesgo de desarrollarla en otros lechos vasculares (Viles-Gonzalez, Fuster et al. 2004). Sus manifestaciones clínicas dependen del lecho vascular afectado. En las coronarias se manifiesta por la aparición de síndrome coronario agudo, infarto agudo de miocardio o muerte súbita. En el cerebro cursa clínicamente como un accidente cerebrovascular agudo o como un accidente isquémico transitorio, y los episodios repetidos pueden desembocar en una demencia multiinfarto. En las arterias periféricas, la expresión clínica es la claudicación intermitente o la isquemia aguda de los miembros inferiores. Estas manifestaciones clínicas se pueden presentar de forma crónica por estenosis de la luz arterial como en la angina estable o en la claudicación intermitente, o de forma aguda, por la súbita rotura de la placa y la formación de un trombo como sucede en los síndromes coronarios agudos o en los ictus isquémicos (Lahoz and Mostaza 2007).

El inicio de la enfermedad se localiza preferentemente en las bifurcaciones y curvaturas de las arterias, donde el flujo es turbulento y oscilante y el las fuerzas de cizallamiento bajas ($<6 \text{ din/cm}^2$), lo que provoca una disminución de la producción de NO, con el consiguiente aumento de la permeabilidad endotelial, de la expresión de moléculas de adhesión y de citoquinas inflamatorias como el TNF- α (Berk, Abe et al. 2001). En estas zonas, las condiciones hemodinámicas junto con los factores de riesgo cardiovascular van a provocar la disfunción del endotelio vascular siendo ésta la primera etapa de la formación de la lesión aterosclerótica (Figura 1) que consiste, como se ha descrito previamente, en un aumento de la permeabilidad endotelial, acompañado de un aumento en la migración y adhesión de leucocitos; esto permite la entrada de lipoproteínas y de otros constituyentes del plasma a la pared arterial, así como la acumulación en la matriz subendotelial de colesterol procedente de las lipoproteínas de baja densidad (LDLc). Cuando existe un exceso de lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes, aumenta el transporte y la retención de las mismas en los lugares donde la permeabilidad es mayor. Las LDL difunden a través del endotelio y quedan retenidas en la íntima debido a la interacción entre la molécula de la apolipoproteína B de las LDL y los proteoglicanos de la matriz subendotelial (Boren, Olin et al. 1998), lo que favorece su degradación proteolítica y su oxidación. La modificación de las LDL va a incrementar su aterogenicidad: en primer lugar se generan LDL mínimamente modificadas, que presentan un grado de oxidación relativamente bajo, pero que activan el endotelio y poseen mayor capacidad que las LDL nativas de inducir adhesión de monocitos. Posteriormente aumenta el grado de oxidación transformándose en LDL oxidadas. La acumulación de partículas de LDL oxidadas estimula en el endotelio activado la producción de moléculas proinflamatorias, incluyendo moléculas de adhesión celular (VCAM-1, PCAM-1, ICAM-1, P-selectina, E-selectina), proteínas quimiotácticas (MCP-1) y factores de crecimiento (M-CSF). Todo ello ocasiona la llegada de monocitos y linfocitos a la pared arterial. Inicialmente los monocitos interaccionan lábilmente con el endotelio a través de las selectinas. Posteriormente, la sobreexpresión de VCAM-1 e ICAM-1 en el endotelio activado va a permitir una unión más estable a través de receptores específicos, como las integrinas. Los monocitos adheridos al endotelio penetran en la íntima a través de los espacios intercelulares, atraídos por las LDL oxidadas y por sustancias quimiotácticas sintetizadas por el endotelio activado, como MCP-1. Una vez en la íntima, las LDL oxidadas, y citoquinas como el TNF γ y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), inducen su diferenciación en macrófagos. Estos presentan en su superficie receptores "scavenger" que reconocen y captan las LDL oxidadas y lipoproteínas ricas en triglicéridos transformándose en células espumosas, "foam cells". La acumulación de células espumosas conduce a la formación de las estrias grasas. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son importantes en la protección frente a la aterosclerosis por un doble mecanismo: por una parte son capaces de eliminar el exceso de colesterol acumulado en la matriz subendotelial y en el

interior de las células espumosas (Tall, Jiang et al. 2000) y, por otra, actúan como un factor que protege de la oxidación lipídica.

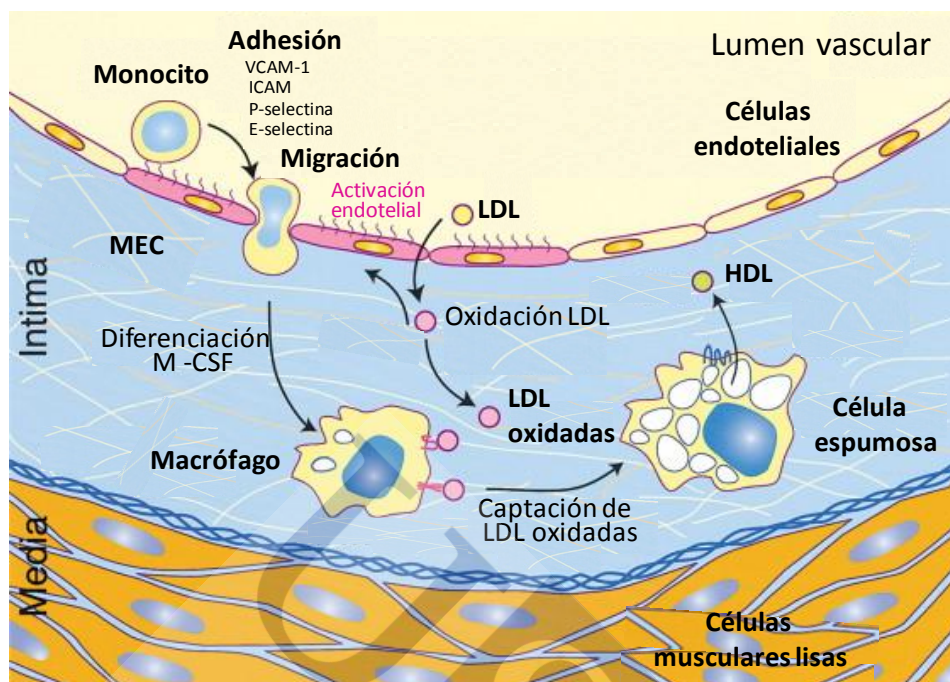


Figura 1: Fase inicial en la formación de la lesión aterosclerótica: aumenta la permeabilidad endotelial, las LDL pasan al espacio subendotelial donde se oxidan. Las LDL oxidadas, estimulan la expresión de moléculas proinflamatorias (moléculas de adhesión, proteínas quimiotácticas). Los monocitos migran al espacio subendotelial transformándose en macrófagos, y éstos se transforman en células espumosas al captar LDL oxidadas. MEC: matriz extracelular; VCAM: moléculas de adhesión de células vasculares; ICAM: moléculas de adhesión intercelular; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad. Modificado de (Glass and Witztum 2001).

En un estadio posterior (Figura 2) una vez constituida la estría grasa, se forma la placa fibrosa, caracterizada por la migración de las células musculares lisas desde la capa media hacia la matriz subendotelial donde proliferan y captan lipoproteínas modificadas contribuyendo así, junto con las células espumosas, al engrosamiento del núcleo lipídico, que se asocia a una disminución del grosor de la capa media. Estas células musculares lisas secretan proteínas de la MEC como colágeno y proteoglicanos, lo que aumenta la retención y agregación de lipoproteínas modificadas y conduce al desarrollo de la placa fibrosa. Esta fase del desarrollo de la lesión está influenciada por las interacciones entre monocitos/macrófagos y células T, que dan como resultado una amplia gama de respuestas humores y celulares y la adquisición de muchas características de un estado inflamatorio crónico (Glass and Witztum 2001).

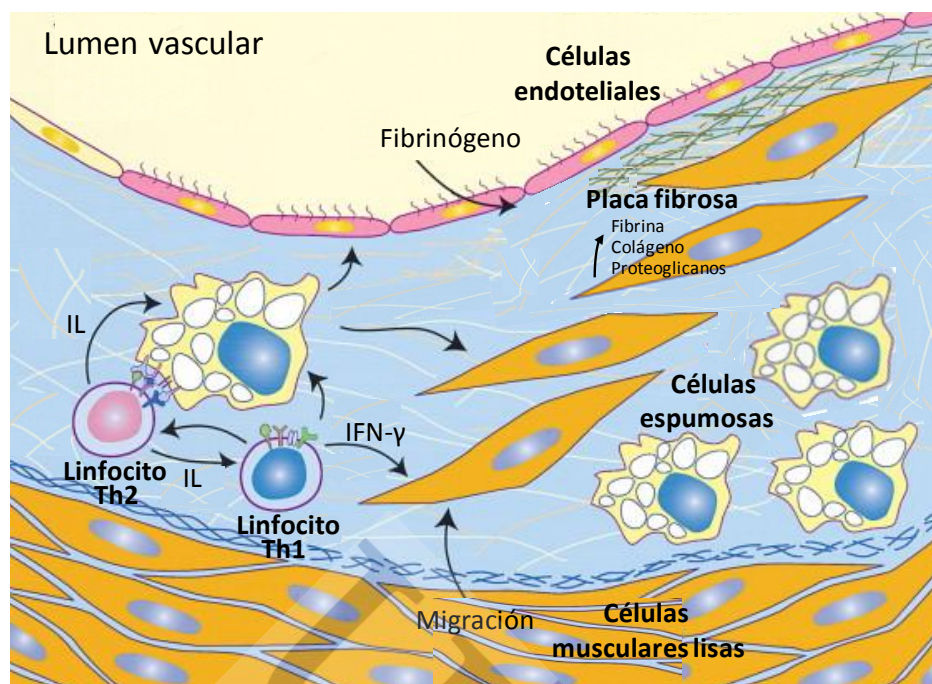


Figura 2: Formación de la placa fibrosa: las células musculares lisas migran al espacio subendotelial donde proliferan, captan lipoproteínas modificadas y secretan proteínas de la matriz extracelular formando la placa fibrosa. Las interacciones entre las células espumosas y los linfocitos T establecen un proceso inflamatorio crónico. Los macrófagos y los linfocitos secretan citoquinas con efectos pro y antiaterogénicos. IFN- γ : interferón gamma; IL: interleucinas. Modificado de (Glass and Witztum 2001).

La respuesta proliferativa de las células musculares lisas y de las células inflamatorias, hace que la estría grasa evolucione a una placa aterosclerótica más compleja, llevando la lesión a estadios más avanzados que implican muerte celular, rotura de la placa, calcificación y procesos trombóticos. Las placas ateromatosas más avanzadas presentan un núcleo necrótico que consiste en un gran núcleo lipídico rodeado por una delgada cubierta fibrosa. Las células espumosas pueden morir liberando gran cantidad de lípidos a la MEC, formándose así el núcleo necrótico al que contribuyen además los lípidos intracelulares captados por las células musculares lisas (Bennett 1999).

Se desconocen los mecanismos inductores de apoptosis en los macrófagos y en las células musculares lisas, aunque se ha sugerido que las partículas de LDL oxidadas podrían participar en este proceso a consecuencia de su capacidad de inducir la muerte de diversos tipos celulares (Berliner and Heinecke 1996). La estabilidad de las placas depende del mantenimiento de la placa fibrosa que, a su vez, depende del equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas de la matriz. Las células musculares lisas sintetizan las fibras de colágeno y los proteoglicanos de la matriz extracelular, mientras que los macrófagos secretan varias proteasas como colagenasas y catepsinas que las degradan (Martín Bautista 2006).

La principal causa subyacente de las enfermedades cardiovasculares es la aterosclerosis, la cual es una enfermedad multifactorial con etiología genética y ambiental que se desarrolla durante décadas en respuesta a los efectos biológicos de los factores de riesgo cardiovasculares (Ross 1999; Nabel and Braunwald 2012). Estos factores se pueden clasificar en modificables (la hipertensión arterial, el tabaco, la dislipemia, la diabetes, la obesidad, el sedentarismo, la inflamación y los factores psicosociales) y no modificables (la predisposición genética, la edad y el sexo masculino). Los principales factores de riesgo modificables son la dislipemia (el aumento de LDL y/o disminución de HDL), la hipertensión y el tabaquismo. Los hábitos nutricionales, especialmente la grasa de la dieta, están implicados en el proceso de aterosclerosis. Numerosos estudios mostraron que la administración aguda de una dieta rica en

grasa induce una alteración transitoria de la función endotelial. Estos efectos se observaron con diferentes tipos de grasas incluyendo los ácidos grasos saturados, monoinsaturados, y ácidos grasos *trans* (Vogel 2000; Cuevas and Germain 2004). En los países desarrollados se estima que sobre un 2% de la ingesta total de calorías procede de ácidos grasos *trans* (Nicolaiew, Lemort et al. 1998), los cuales tienen efectos proinflamatorios e inducen disfunción endotelial (Lopez-Garcia, Schulze et al. 2005). Por el contrario, se ha demostrado que la dieta mediterránea, caracterizada por un bajo contenido de ácidos grasos saturados, reduce la disfunción endotelial y los marcadores de inflamación vascular en pacientes con síndrome metabólico (Esposito, Marfella et al. 2004; Estruch, Martinez-Gonzalez et al. 2006), así como la resistencia a la insulina (Ryan, McInerney et al. 2000). M de Lorgeril et al. confirmaron que los beneficios de la dieta mediterránea en pacientes que se recuperaron de un infarto de miocardio son debidos no solo al bajo contenido de ácidos grasos saturados sino también al contenido de ácido oleico presente en el aceite de oliva (de Lorgeril, Salen et al. 1999). Una posible explicación a los efectos de los ácidos grasos insaturados es que disminuyen la expresión de ICAM lo que reduciría la adhesión de leucocitos al endotelio disfuncional (Bemelmans, Lefrandt et al. 2002). Además las LDL enriquecidas en ácido oleico reducen la quimiotaxis y la adhesión de leucocitos cuando están expuestas a estrés oxidativo (Tsimikas, Philis-Tsimikas et al. 1999; Covas 2007). El potencial papel ateroprotector de la dieta mediterránea durante el proceso aterogénico se representa en la Figura 3 (Favero, Paganelli et al. 2014).

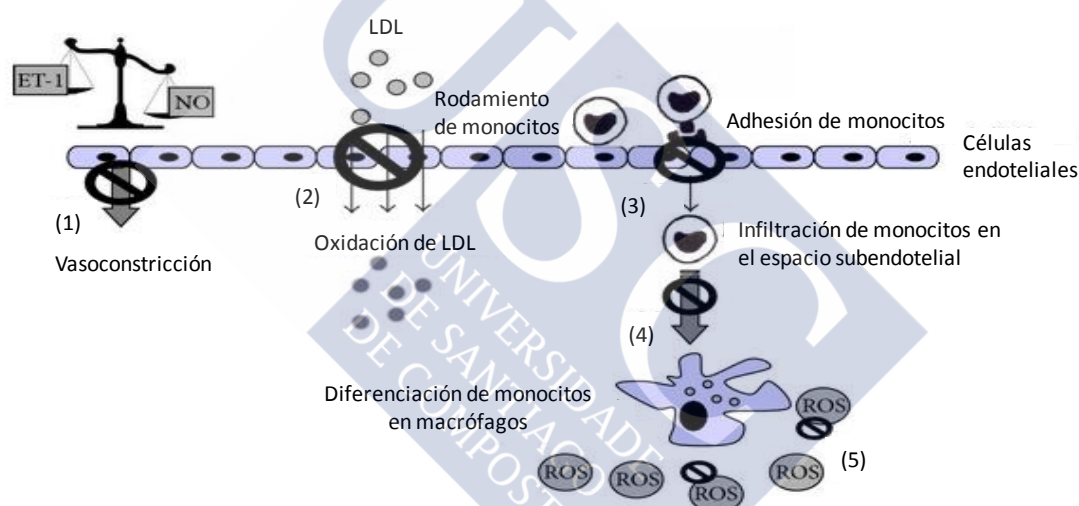


Figura 3: Potencial papel ateroprotector de la dieta mediterránea durante el proceso aterogénico. La dieta mediterránea, debido a sus propiedades antioxidantes, puede (1) inhibir/reducir el desequilibrio entre la vasoconstricción y vasodilatación, (2) prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, (3) inhibir la adhesión de monocitos a las células endoteliales y la infiltración de monocitos en el espacio subendotelial, (4) reprimir la diferenciación de los macrófagos en los macrófagos cargados de lípidos (células espumosas), y (5) reducir la síntesis de especies reactivas de oxígeno. ET-1: endotelina-1; LDL: lipoproteínas de baja densidad; NO: óxido nítrico; ROS: especies reactivas de oxígeno.

1.5-Dieta mediterránea

Se considera como dieta mediterránea (Figura 4) al patrón tradicional de alimentación de los países en los que típicamente crecen los olivos como Creta, Grecia, sur de Italia y España de finales de la década de los años 50 y 60. Las principales características de esta dieta son:

- Un alto consumo de cereales, legumbres, frutos secos, frutas y verduras.
- Un consumo relativamente alto de grasa (hasta un 40% del total de ingesta energética), principalmente en forma de ácidos grasos monoinsaturados, que deben suponer un 20% ó más de la ingesta energética total.
- Uso de aceite de oliva para uso culinario y para aliñar las ensaladas y verduras, como fuente principal de grasa visible.

- Consumo moderado-alto de pescado.
- Consumo en cantidades moderadas o bajas de pollo y derivados lácteos (generalmente en forma de yogurt o queso fresco).
- Bajo consumo de carnes rojas y productos derivados de la carne.
- Consumo moderado de alcohol, principalmente en forma de vino tinto consumido con las comidas.

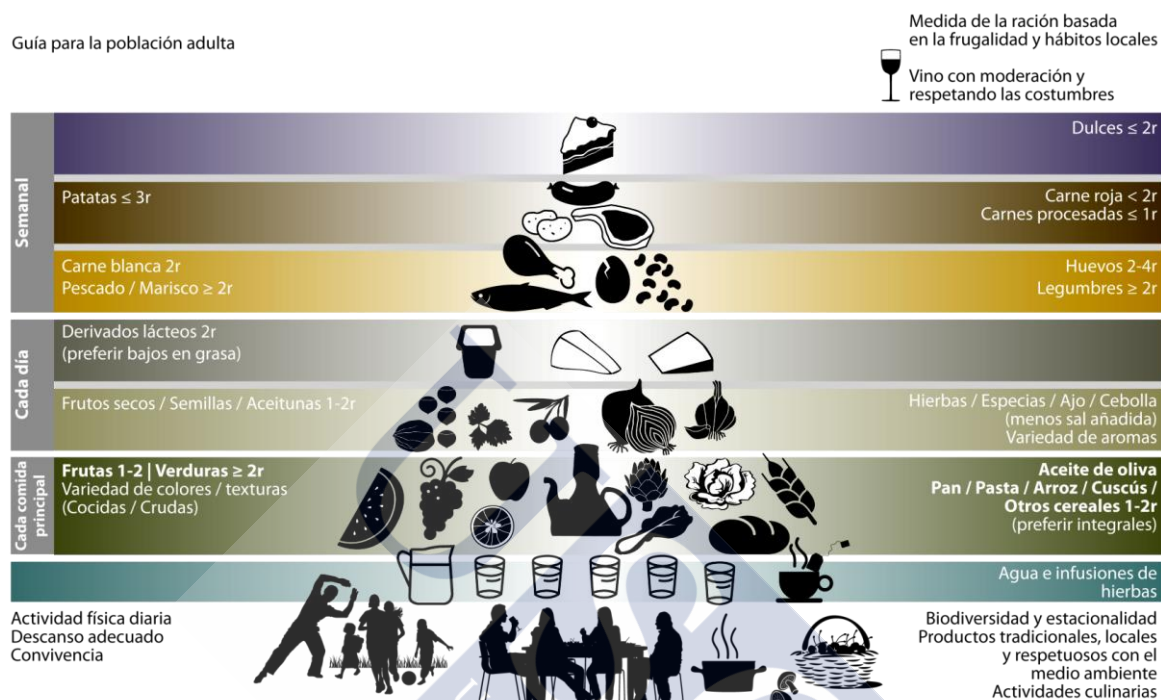


Figura 4: Pirámide de la dieta mediterránea confeccionada por la Fundación de la Dieta Mediterránea de Barcelona (2010) (Fuente: Mediterranean Diet Foundation, www.dfmmed.org) (Bach-Faig, Berry et al. 2011).

Este patrón dietético se caracteriza por la ingesta de baja cantidad de grasas saturadas (menos del 10% de la energía total), un contenido elevado de ácidos grasos monoinsaturados y la casi inexistencia de ácidos grasos *trans* (Keys, Menotti et al. 1986). Los resultados de numerosos estudios han llevado a considerarla como un factor protector frente a enfermedades cardiovasculares, distintos tipos de cáncer, ciertas enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento. A finales de los años 70, al analizar los resultados del estudio de los Siete Países que se inició en 1958, en el cual se reclutaron 12.763 hombres entre 40 y 59 años en 16 cohortes pertenecientes a siete países: Finlandia, Italia, Holanda, Grecia, Yugoslavia, Estados Unidos y Japón (Keys, Menotti et al. 1986), Ancel Keys et al. intuyeron por primera vez las características saludables de la dieta consumida en los países mediterráneos, al constatar que la esperanza de vida de sus habitantes era la más alta del mundo, mientras que las tasas de incidencia de enfermedades cardiovasculares eran más bajas en comparación a la de países del Norte de Europa o Estados Unidos. Al analizar las dietas se encontró que la cantidad de grasa consumida tanto en Grecia como en Estados Unidos era moderada, mientras que en Japón era muy baja. La principal diferencia era la composición de la grasa de la dieta, siendo en Estados Unidos principalmente grasas saturadas, mientras que en Grecia eran grasas monoinsaturadas procedentes principalmente del aceite de oliva. Estos resultados han sido confirmados en otros estudios más recientes como, por ejemplo, el proyecto MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) que se realizó entre los años 1985 y 1993, coordinado por la Organización Mundial de la Salud (Tunstall-Pedoe, Kuulasmaa et al. 1999) en el que participaron 39 centros de 26 países de todo el mundo (Bothig 1989).

En estudios preliminares, la dieta mediterránea se asoció inversamente con la mortalidad por cualquier causa en varios pequeños estudios observacionales de cohortes de personas mayores (Trichopoulou, Kouris-Blazos et al. 1995; Kouris-Blazos, Gnardellis et al. 1999; Lasheras, Fernandez et al. 2000). Los resultados del estudio de la cohorte EPIC de Grecia, que incluyó a más de 22.000 participantes, sugirieron que una mayor adherencia a la dieta mediterránea tradicional se asocia a una menor mortalidad global y, más específicamente, a una menor mortalidad por enfermedad coronaria (Trichopoulou, Costacou et al. 2003). En el seguimiento del estudio HALE con personas sanas de edades entre 70 y 90 años, se observaron resultados similares (Knoops, de Groot et al. 2004), al igual que en el NIH-AARP Diet and Health study (Mitrou, Kipnis et al. 2007) y en el Nurses Health study (Fung, Rexrode et al. 2009). En dos estudios caso-control también se observó una relación inversa entre adherencia a la dieta mediterránea e incidencia de infarto de miocardio no fatal (Martinez-Gonzalez, Fernandez-Jarne et al. 2002; Panagiotakos, Pitsavos et al. 2002). Las conclusiones obtenidas en los estudios epidemiológicos de grandes cohortes solo tienen un nivel intermedio de calidad de evidencia científica y no permiten inferir causalidad debido a la existencia de factores de confusión residuales y/o efectos no conocidos. Por esto, son necesarios estudios aleatorizados de intervención nutricional en los que se valoren los efectos protectores de diferentes patrones dietéticos sobre la mortalidad global y la incidencia de las principales patologías crónicas, como enfermedad cardiovascular, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Estruch 2014). En este sentido, hasta el momento solo se han realizado dos ensayos clínicos, el estudio PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) y el "Lyon Diet Heart Study" que han analizado los efectos de una intervención con dieta mediterránea en la prevención primaria y secundaria respectivamente, de la enfermedad cardiovascular. En el estudio "Lyon Diet Heart Study" (de Lorgeril, Salen et al. 1999), realizado en pacientes con cardiopatía isquémica que fueron randomizados a recibir una dieta baja en grasa, o bien una dieta de tipo mediterráneo suplementada con una margarina rica en ácido linolénico, se observó una reducción importante (entre el 50 y el 70%) en la mortalidad cardiovascular y en los nuevos casos de infarto agudo de miocardio en el grupo que fue sometido a dieta mediterránea. Sin embargo, a pesar de tratarse de un ensayo aleatorizado, presenta graves limitaciones metodológicas: a) sólo es aplicable para prevención secundaria ya que analizó los reinfartos y las muertes coronarias en pacientes que habían sufrido un evento coronario, b) la fuente de grasa que empleó (ácido linolénico procedente de una margarina obtenida a partir de aceite de canola) no se encuentra comercializada, c) la dieta del grupo control era más rica en grasa que la del grupo de intervención, d) el tamaño muestral era reducido (14 eventos en un grupo y 44 en otro), y e) la valoración dietética durante el seguimiento no fue completa (Arós and Estruch 2013; Estruch 2014).

El ensayo clínico PREDIMED llevado a cabo en España (2003- 2011), se diseñó para demostrar con el máximo nivel de evidencia científica los efectos de una dieta mediterránea tradicional en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular (Martinez-Gonzalez, Corella et al. 2012; Estruch, Ros et al. 2013). En total se incluyeron 7447 participantes, de edades comprendidas entre 55 y 80 años (varones) o 60 y 80 años (mujeres) sin manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular en el momento de la inclusión, pero con una alta probabilidad de presentarlas, ya que se trataba de sujetos con riesgo vascular alto. La mitad, aproximadamente, presentaban diabetes mellitus, y la otra mitad, tres o más factores de riesgo vascular (tabaquismo, hipertensión arterial, dislipemia [colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) elevado y/o colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL) bajo], sobrepeso u obesidad, o historia familiar de cardiopatía isquémica precoz). Estos participantes se asignaron de forma aleatoria a tres grupos de intervención dietética: una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra (2487 participantes), una dieta mediterránea suplementada con frutos secos (2396 participantes) o una dieta baja en todo tipo de grasa (2349 participantes). Cada 3 meses todos los participantes recibieron una intervención dietética personalizada dirigida a aumentar su adhesión a la dieta mediterránea o a una dieta baja en grasas, en función del grupo asignado y fueron evaluados anualmente. El objetivo principal del estudio fue valorar la eficacia de la dieta mediterránea en

la incidencia de infarto de miocardio no fatal, accidente cerebrovascular y de la mortalidad cardiovascular, y el objetivo secundario fue valorar los efectos en la incidencia de cáncer (mama, colorrectal, pulmón y gástrico), diabetes mellitus y la mortalidad total. También se valoraron los efectos de la dieta sobre la presión arterial, la adiposidad, la glucemia, el perfil lipídico y los marcadores sistémicos de enfermedad cardiovascular. Con este estudio se demostró que el seguimiento de una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra o frutos secos (nueces, avellanas y almendras) reduce en un 30% el riesgo relativo de sufrir una complicación cardiovascular en pacientes asintomáticos con alto riesgo vascular, comparada con una dieta baja en grasa (Estruch, Ros et al. 2013) (Figura 5).

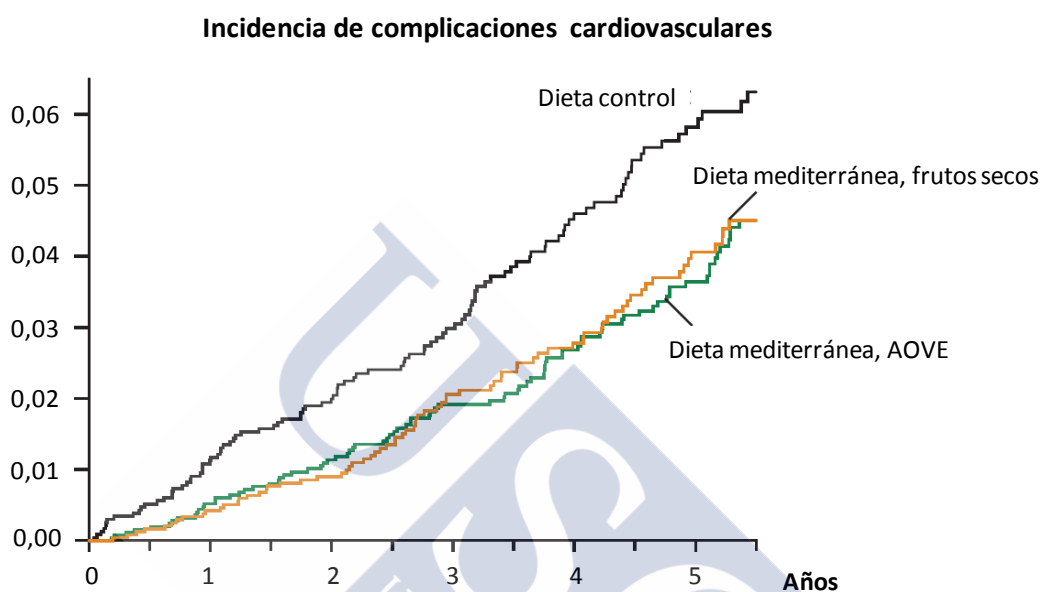


Figura 5: Incidencia de complicaciones cardiovasculares en los 7447 participantes en el estudio PREDIMED según análisis de estimaciones de Kaplan-Meier. La variable final analizada es un agregado de complicaciones cardiovasculares que incluye muerte de causa cardiovascular, infarto de miocardio y/o accidente vascular cerebral. Modificado de (Estruch, Ros et al. 2013). AOVE: aceite de oliva virgen extra.

Como se ha mencionado anteriormente en esta introducción, entre los mecanismos relacionados con el desarrollo de aterosclerosis se encuentran, entre otros, la disfunción endotelial, la inflamación, el estrés oxidativo y factores genéticos. La concentración elevada en plasma de LDL es un potente factor aterogénico y las partículas oxidadas de LDL resultan críticas en los procesos de inicio y progresión de la aterosclerosis. Durante el estudio PREDIMED se detectó una reducción en las partículas circulantes de LDL oxidadas en los dos grupos expuestos a dieta mediterránea después de tres meses (Fito, Guxens et al. 2007). También se observó que a los 3 meses, ambas intervenciones con dieta mediterránea reducían las cifras de presión arterial, y mejoraban el perfil lipídico (con aumento del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad y reducción del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad) (Estruch, Martínez-González et al. 2006). Asimismo, tras un año de intervención se comprobó que ambas dietas mediterráneas aumentaban la concentración de las partículas de HDL de mayor tamaño, y que la dieta mediterránea suplementada con frutos secos incrementaba además la fracción de partículas de colesterol LDL menos aterogénicas (Damasceno, Sala-Vila et al. 2013). Al año de intervención, se comprobó que una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen o frutos secos, además de reducir la presión arterial en sujetos hipertensos, induce cambios en la composición lipídica y las propiedades estructurales de las membranas de los eritrocitos (Barcelo, Perona et al. 2009) y paralelamente también reduce la incidencia de síndrome metabólico (Salas-Salvado, Fernández-Ballart et al. 2008). En este mismo estudio, se observó una disminución de moléculas inflamatorias circulantes, tanto séricas como celulares, después de tres meses de

intervención (Estruch, Martínez-Gonzalez et al. 2006) y un año (Mena, Sacanella et al. 2009; Urpi-Sarda, Casas et al. 2012). Esto indica que la dieta mediterránea también previene, al menos parcialmente, la inflamación, otro de los factores de riesgo mencionados anteriormente. Estos estudios mostraron una disminución en la expresión de genes proateroscleróticos relacionados con la inflamación vascular (Llorente-Cortes, Estruch et al. 2010). Otro subestudio del PREDIMED, demostró una reducción en el grosor de la capa íntima-media en participantes con grosor elevado en esta capa en ambos grupos de dieta mediterránea indicando una regresión de las lesiones arterioscleróticas (Murie-Fernandez, Irimia et al. 2011). Posteriormente se comprobó que el grupo que siguió la dieta mediterránea suplementada con frutos secos, también presentaba una regresión de las placas de ateroma, mientras que en los que siguieron la dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra se observó un retraso en la progresión de estas lesiones en comparación al grupo control (Sala-Vila, Romero-Mamani et al. 2014). Aunque no quedan claros los mecanismos involucrados, estos efectos se atribuyen a los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de la dieta mediterránea (Konstantinidou, Covas et al. 2010). De hecho, estudios nutrigenómicos demostraron que esta dieta reprime la expresión de genes proaterogénicos relacionados con la inflamación, la formación de células espumosas y la trombosis (Llorente-Cortes, Estruch et al. 2010). Por todo esto, los efectos de la dieta mediterránea se explican, al menos en parte, por su acción sobre factores clásicos y emergentes en el sistema cardiovascular, así como también por sus efectos inhibitorios sobre la expresión de genes proaterogénicos, e inductores en la expresión de genes antiaterogénicos.

Durante el estudio PREDIMED también se estudió si los efectos de la dieta mediterránea variaban en función del acervo genético individual de los participantes, a fin de determinar los efectos de las diferentes variables genéticas sobre los fenotipos intermedios (presión arterial, lípidos, etc.) y su interacción con la dieta, así como los efectos de estas interacciones sobre los fenotipos finales (enfermedad cardiovascular y cáncer principalmente). Esto llevó a la demostración de que los polimorfismos en la COX-2 e IL-6, ambos relacionados con la inflamación, COX-2-765G>C e IL-6-174G>C, están asociados a una menor concentración sérica de IL6 e ICAM-1 en los portadores del alelo variante de COX-2 y a mayores concentraciones de ICAM-1 en los portadores del alelo variante de IL-6, sin apreciarse interacción gen-dieta después de la intervención. La dieta mediterránea disminuyó todos los marcadores inflamatorios en todos los participantes, independientemente de su genotipo. Esto indica que el efecto antiinflamatorio se relaciona más con el grado de adherencia a la dieta que con las características genotípicas de los participantes (Corella, Gonzalez et al. 2009). Finalmente, cabe destacar que la dieta mediterránea ha resultado útil para reducir el riesgo genético de sufrir un accidente cerebrovascular (Corella, Carrasco et al. 2013). La intervención con dieta mediterránea en portadores del polimorfismo TCF7L2 rs7903146 (C>T), en el gen codificante para TCF7L2 asociado a la diabetes, anuló el efecto adverso del polimorfismo sobre los factores de riesgo vascular (glucosa y lípidos) y sobre la incidencia de accidente vascular cerebral. A mayores, la dieta mediterránea sin restricción calórica es especialmente útil en la prevención de la diabetes mellitus en pacientes con alto riesgo vascular (Salas-Salvado, Bullo et al. 2011).

El estudio PREDIMED ha demostrado por primera vez que la dieta mediterránea tradicional incrementa la longevidad y ejerce un potente efecto protector frente a la aparición y el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Se confirman los efectos beneficiosos de este patrón de alimentación sobre los principales factores de riesgo vascular y este efecto protector se ejerce independientemente de la edad, el género y los factores de riesgo vascular, y es especialmente eficaz en las personas genéticamente susceptibles de sufrir una enfermedad cardiovascular (Estruch 2014).

Una de las principales características de la dieta mediterránea tradicional es el elevado consumo de aceite de oliva como fuente principal de grasa añadida. A su vez, gran parte de las presumibles propiedades antiaterogénicas del aceite de oliva se atribuyen a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados, principalmente ácido oleico (Hausenloy and Yellon 2008), el cual representa entre el 55-83% del contenido de ácidos grasos presentes en el aceite de

oliva dependiendo de la zona de producción, del clima, del grado de madurez de las aceitunas y de su variedad (Guillén, Acín et al. 2009).

1.6-Ácidos grasos y sistema cardiovascular

Los ácidos grasos son moléculas con fórmula general $R-COOH$, donde R representa una cadena alquílica constituida por átomos de carbono unidos entre sí por uno o dos enlaces, completando su valencia cuaternaria con átomos de hidrógeno. Según Karnovsky (Karnovsky 1979), los ácidos grasos libres se pueden clasificar en dos grupos: ácidos grasos tipo A o *cis*-insaturados (ácido oleico, ácido palmitoleico), y ácidos grasos tipo B, grupo que estaría integrado por los ácidos grasos saturados (p. ej. ácido esteárico) y por los *trans*-insaturados (p. ej. ácido elaídico).

El ácido oleico es un ácido graso *cis*-monoinsaturado (18:1 Δ^9), que se encuentra en grandes proporciones en el aceite de oliva y al cual se le atribuyen propiedades beneficiosas frente a enfermedades cardiovasculares (Moreno and Mitjavila 2003), principalmente porque produce una disminución de los niveles de colesterol total y de LDLc, y aumenta el HDLc (Grundý 1997) al incrementar la actividad de los receptores de LDL. Además limita la oxidación de las LDL, disminuyendo su poder aterogénico, debido a que las partículas de LDL enriquecidas en ácidos grasos monoinsaturados son más resistentes a la oxidación por radicales libres (Mata, Varela et al. 1997). El ácido oleico también ejerce un efecto beneficioso en los procesos inflamatorios que se desencadenan en las etapas tempranas de la aterosclerosis, ya que reduce la expresión de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) en linfocitos (Sanderson, Yaqoob et al. 1995) y de VCAM-1 en monocitos (Mata, Alonso et al. 1996; Yaqoob 1998). Además inhibe la activación del factor nuclear NF- κ B (NF- κ B), el cual regula la expresión génica de citoquinas y de moléculas de adhesión (Carluccio, Massaro et al. 1999). Aparte de disminuir la adhesión de los monocitos a la pared endotelial, disminuye la proliferación de las células musculares (Mata, Varela et al. 1997), siendo ambos procesos importantes para prevenir la formación de la placa de ateroma. El ácido oleico modula la coagulación y el sistema fibrinolítico, ya que reduce los niveles del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI) (Lopez-Segura, Velasco et al. 1996) y del factor de von Willebrand (vWF), e inhibe la agregación plaquetaria inducida por el factor activador de plaquetas (PAF) (Nunez, Randon et al. 1990) lo que sugiere un efecto beneficioso sobre la función endotelial que va a resultar en un menor riesgo trombogénico (Perez-Jimenez, Castro et al. 1999). Recientemente se ha demostrado que el ácido oleico regula la estructura lipídica de la membrana incrementando la propensión a formación de fases no lamelares, lo que favorece el acoplamiento de ciertas proteínas periféricas de señalización implicadas en el control de la presión arterial como proteínas G, lo cual se relaciona con su efecto hipotensor (Teres, Barcelo-Coblijn et al. 2008).

Se ha comprobado que el efecto protector del ácido oleico depende del doble enlace *cis* de la molécula de ácido oleico, ya que su isómero *trans*, el ácido elaídico, parece tener un efecto sobre la colesterolemia similar al de los ácidos grasos saturados, aumentando el colesterol total y el LDLc. Además, el ácido elaídico disminuye los niveles de HDLc, por lo que ejerce efectos más perjudiciales sobre el sistema cardiovascular que los ácidos grasos saturados (Ascherio, Katan et al. 1999). Los ácidos grasos *trans*-insaturados poseen efectos pro-inflamatorios (aumentan los niveles plasmáticos de IL-6 y de proteína C reactiva) y provocan disfunción endotelial ya que aumentan los niveles de moléculas de adhesión: VCAM-I, ICAM-I, y E-selectina (Lopez-Garcia, Schulze et al. 2005). Al igual que los ácidos grasos *trans*-insaturados, los ácidos grasos saturados de cadena larga también poseen efectos pro-inflamatorios, en células endoteliales. Estos ácidos grasos, a bajas concentraciones, incrementan significativamente la expresión de ICAM-1 activando I κ B- α y NF- κ B (Harvey, Walker et al. 2010a).

1.7-Membranas biológicas

Las membranas biológicas son estructuras laminares, finas, flexibles y relativamente estables que rodean a las células y sus orgánulos. Su función básica es actuar de barrera física selectiva impidiendo la salida de moléculas e iones fuera de la célula o de los orgánulos hacia sus alrededores, y permitiendo la entrada oportuna de nutrientes y la eliminación de productos de desecho. Además las membranas desempeñan un papel clave en el procesamiento de la información y en la generación de energía. La mayoría de las membranas biológicas poseen la misma estructura básica: una bicapa lipídica formada fundamentalmente por fosfolípidos en la que están insertadas diversas proteínas (McKee and McKee 2003). Los fosfolípidos están compuestos por una molécula de glicerol unida a una parte hidrofóbica (dos moléculas de ácido graso) y conectada a través del ácido fosfórico a una cabeza hidrofílica (colina, etanolamina, serina, inositol). En la posición sn-1 del glicerol se sitúa preferentemente un ácido graso saturado y en la posición sn-2 un ácido graso *cis*-mono o poliinsaturado [los ácidos grasos que se encuentran en mamíferos poseen casi exclusivamente configuración *cis* (Stubbs and Smith 1984) y todas las funciones metabólicas y estructurales de los ácidos grasos se encuentran asociadas a la isomería *cis* (Nakamura and Nara 2004)]. Esto permite la disposición especial de la bicapa lipídica, que incorpora moléculas hidrofóbicas en su parte interna e hidrofílicas en la externa. La estabilidad de la membrana se incrementa por la presencia de colesterol y de proteínas específicas: cuanto mayor sea el contenido de dichas moléculas, menor será la fluidez de la membrana (Risso, Pellegrino et al. 2014).

La membrana se comporta como un fluido bidimensional anisotrópico donde las moléculas lipídicas y proteicas que lo constituyen se desplazan libremente en cualquier dirección del plano de la membrana (Zimmer and Freisleben 1988). La fluidez de la bicapa lipídica o la facilidad con la que las moléculas que la constituyen se desplazan en ella, es un factor determinante para su función y debe de preservarse dentro de ciertos límites. De hecho existe una fluidez óptima para funciones específicas de las membranas y su alteración modifica su función originando una patología (Reiter 1998).

El grado de fluidez de la membrana depende de su composición y, sobre todo, de la naturaleza de las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos: cuanto más compacto sea su agrupamiento, más viscosa será la bicapa. El grado de empaquetamiento de las colas hidrocarbonadas en la bicapa lipídica depende de la longitud y del grado de insaturación del ácido graso. Una menor longitud de la cadena reduce la interacción de las colas hidrocarbonadas entre sí, y por lo tanto aumenta la fluidez en la bicapa. La longitud de las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos varía entre 14 y 24 átomos de carbono. En cuanto a la insaturación, la mayoría de los fosfolípidos contienen una cola hidrocarbonada con uno o más dobles enlaces *cis* y una segunda saturada. Cada doble enlace *cis* en una cola insaturada determina la formación de una zona bisagra que dificulta el agrupamiento de las colas entre sí produciéndose un aumento de la fluidez (Alberts, Bray et al. 2006). En las células eucariotas la fluidez de la membrana también se regula con el colesterol, el cual se inserta con su grupo hidroxilo C3 próximo a las cabezas polares de los fosfolípidos, y su región apolar integrada entre las cadenas hidrocarbonadas apolares de los mismos, de manera que rellenan los espacios que separan a las moléculas de fosfolípidos (Storch and Kleinfeld 1985).

A temperaturas fisiológicas, las bicapas lipídicas de las membranas celulares tienen carácter fluido. Esta fluidez, aparte de proporcionar la flexibilidad que requiere la membrana para diversos procesos (cambios de forma, endocitosis, exocitosis), puede ser crítica para la función de muchas proteínas, bien porque la actividad de la proteína dependa de su difusión en el plano de la membrana o bien porque su funcionamiento implique cambios de conformación dentro de la bicapa (Kimmelberg 1977).

Los tipos de ácidos grasos de la dieta determinan los ácidos grasos que estarán disponibles para formar las membranas celulares (Yehuda, Rabinovitz et al. 2002; Jihan Seid 2013). Tras su aumento en plasma se incorporan con rapidez en las membranas biológicas (Karnovsky 1979; Renaud, Bouma et al. 1985) modificando la fluidez de las mismas. Estructuralmente los ácidos grasos *trans* son muy similares a los ácidos grasos saturados, por lo tanto ejercen su

influencia de la misma manera sobre la estructura y función de las membranas celulares, aumentando el punto de fusión de los fosfolípidos y alterando en consecuencia la fluidez de las membranas. Este parámetro es determinante para la regulación de la actividad de moléculas que se encuentran insertas en la membrana (enzimas, receptores, transportadores, canales iónicos, entre otros). Estos ácidos grasos tienen un punto de fusión mayor que los ácidos grasos *cis* y una orientación espacial similar a los ácidos grasos saturados, por lo cual reducen la fluidez de la membrana, modulando de manera diferente a los *cis* la actividad de las proteínas insertadas en la membrana, produciendo alteraciones en la estructura celular y en sus funciones. Considerando que los ácidos grasos *trans* presentan una conformación espacial similar a la de los ácidos grasos saturados, se ha postulado que el consumo de este tipo de ácidos grasos podría tener efectos metabólicos similares a los observados con los ácidos grasos saturados (Stender and Dyerberg 2004). En este sentido, abundante evidencia científica indica que los ácidos grasos *trans* modifican negativamente el perfil lipídico, aumentando los niveles de colesterol-LDL y reduciendo los niveles de colesterol-HDL, un efecto similar al observado con los ácidos grasos saturados, por lo cual los ácidos grasos *trans* son considerados nocivos para la salud cardiovascular (Mensink and Katan 1990; Zock and Katan 1992; Katan 1995; Lichtenstein 2000; Mozaffarian, Katan et al. 2006).

1.8-Efecto de los ácidos grasos libres sobre la señalización transmembrana

Los diferentes efectos de los ácidos grasos son posiblemente dependientes de su estructura, ya que los ácidos grasos tipo A, debido a la conformación espacial del doble enlace *cis*, poseen una estructura angular, mientras que los tipo B tienen estructuras lineales (Figura 6). Tras un aumento en el entorno extracelular, los ácidos grasos se incorporan a la bicapa lipídica. Los tipo B, se intercalan sin provocar desorganización de la misma. Por el contrario, los ácidos grasos tipo A causan alteraciones importantes en la región hidrofóbica modificando la fluidez de la membrana y las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína (Karnovsky 1979; Klausner, Bhalla et al. 1980; Pjura, Kleinfeld et al. 1984).

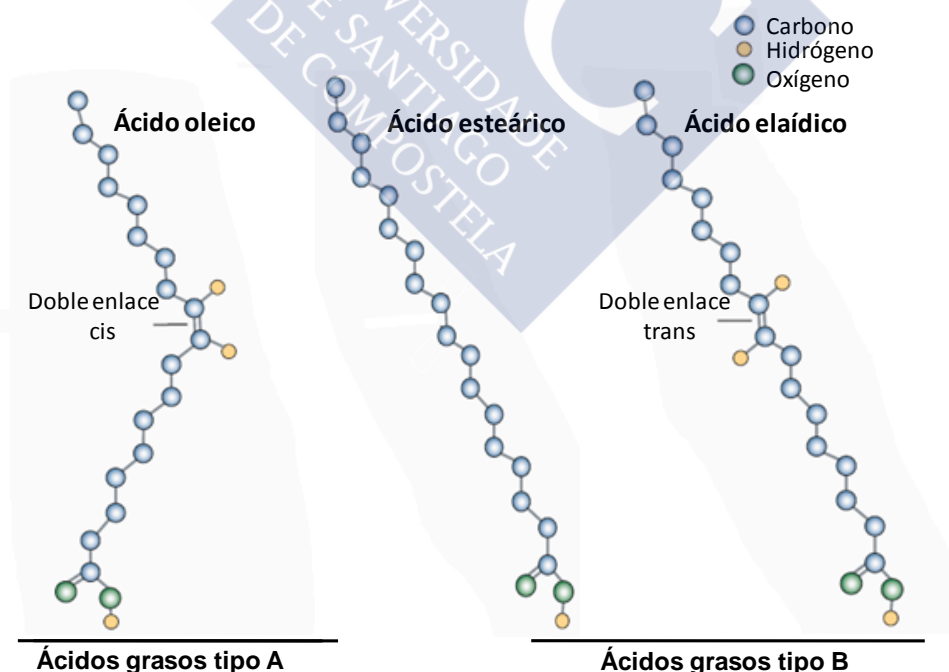


Figura 6: Estructura del ácido oleico (ácido graso tipo A), ácido esteárico y ácido elaídico (ácidos grasos tipo B). Modificada de (Mozaffarian, Katan et al. 2006).

Uno de los modelos utilizados para el estudio del efecto de los ácidos grasos libres sobre la señalización de transmembrana es el receptor de EGF de células fibroblásticas. El EGF (factor de crecimiento epidérmico) al unirse a su receptor EGFR, induce la oligomerización de éste, lo que provoca activación de su dominio tirosín-quinasa y la fosforilación de sustratos intracelulares, entre ellos la propia cola citosólica del EGFR (Schlessinger 2000). La autofosforilación del extremo C-terminal de EGFR da lugar a la activación de la cascada MAPK (Pawson 1995), y al reclutamiento de varias proteínas implicadas en señalización de transmembrana, como la fosfolipasa $C\gamma 1$ (PLC). Esta PLC cataliza la hidrólisis del lípido de membrana PIP_2 en dos segundos mensajeros diferentes: el IP_3 , que conduce a una elevación rápida de $[Ca^{+2}]$ por redistribución de los depósitos de Ca^{+2} intracelulares, y el diacilglicerol (DAG), que activa la proteína-quinasa C (PKC) (Berridge 1987). En fibroblastos, el tratamiento agudo con ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (oleico y palmitoleico) altera la señalización de transmembrana, ya que bloquea reversiblemente el aumento de $[Ca^{+2}]_i$, del potencial de membrana y la generación de IP_3 que se produce tras la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este bloqueo es tiempo y dosis dependiente, lo que indica que esta acción inhibitoria no es debida a una incorporación química en la membrana, sino que se requiere de la presencia de un gradiente químico de ácido oleico en el medio extracelular. La unión del EGF con EGFR, la oligomerización y la autofosforilación del EGFR, no se alteran por el tratamiento con ácidos grasos *cis*-insaturados. El ácido eláidico y diferentes ácidos grasos saturados de distinta longitud de cadena, no bloquean el aumento de $[Ca^{+2}]_i$ y del potencial de membrana inducido por el EGF. Esto sugiere que el efecto de los ácidos grasos sobre la transducción de señales, depende de la conformación espacial del doble enlace, más que de la presencia de dobles enlaces ó de la longitud de la cadena (Casabiell, Pandiella et al. 1991).

Se han estudiado también efectos más distales de los ácidos grasos libres sobre la función celular. Sabemos que tras un aumento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, se produce una inhibición de la secreción de GH (Casanueva, Villanueva et al. 1987). Al igual que sucede con el receptor de EGF, la exposición de las células somatotropas a ácidos grasos *cis*-monoinsaturados, pero no a sus isómeros *trans*, inhibe la generación de IP_3 y el consiguiente incremento de $[Ca^{+2}]_i$ sin afectar a la unión de TRH a su receptor, sugiriendo que los ácidos grasos *cis*-monoinsaturados actúan alterando la interacción entre el receptor activado y sus efectores (Perez, Casabiell et al. 1997). La secreción de GH también es estimulada por el VIP a través de la vía AMPc-PKA, la cual induce la apertura de canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes en la membrana plasmática, con el consiguiente aumento en la $[Ca^{+2}]_i$. Este incremento de la $[Ca^{+2}]_i$ se inhibe por el ácido oleico (pero no por su isómero *trans*), sin alterar la unión con el VIP, induciendo una reducción en la actividad de la adenilato ciclasa y de la PKA (Perez, Camina et al. 1998). El ácido oleico, además, inhibe directamente los canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes de la membrana plasmática (Perez, Camina et al. 1997a). Estos resultados pueden explicar la inhibición de la secreción de GH que se produce al aumentar los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres.

Se cree que los ácidos grasos tipo A al introducirse en la bicapa lipídica, pueden alterar la función de las proteínas integrales de la membrana plasmática, mientras que las proteínas asociadas más libremente a la bicapa serían menos sensibles. Esta hipótesis, explicaría adecuadamente el porqué distintas proteínas de membrana están afectadas en diverso grado por los ácidos grasos *cis*-insaturados. Las proteínas de membrana que tienen sus dominios funcionales hacia el espacio extracelular, y/o hacia el citosol, no son afectadas por los ácidos grasos tipo A, como sucede en el caso de los dominios de unión del receptor de EGF, del receptor de TRH y del receptor VIP (Casabiell, Zugaza et al. 1993; Zugaza, Casabiell et al. 1995a; Perez, Casabiell et al. 1997; Perez, Camina et al. 1998). Las proteínas intracelulares asociadas a la membrana plasmática y con acción enzimática en la bicapa lipídica, como $PLC\gamma 1$, $PLC\beta$, y adenilato ciclasa, serían moderadamente sensibles a los ácidos grasos *cis*-insaturados (Casabiell, Pandiella et al. 1991; Perez, Casabiell et al. 1997; Perez, Camina et al. 1998). Por el contrario, las proteínas integrales de membrana que actúan cambiando su estado conformacional en la bicapa, como los canales de calcio voltaje-independientes (fibroblastos) y los canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes (células somatotropas), serían fuertemente inhibidas

por ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (Casabiell, Pandiella et al. 1991; Perez, Casabiell et al. 1997; Perez, Camina et al. 1998).

La activación del EGFR conduce en último término a la división celular. A pesar del bloqueo inducido por los ácidos grasos *cis*-insaturados en el aumento de $[Ca^{+2}]_i$, del potencial de membrana y de la generación de IP_3 , el ácido oleico no inhibe el aumento en el metabolismo celular inducido por EGF, cuantificado en términos de captación de glucosa, captación de aminoácidos y síntesis proteica (Zugaza, Casabiell et al. 1995a), ni tampoco el potencial mitótico del EGF (Casabiell, Zugaza et al. 1993). Esto indica que los efectos del ácido oleico anteriormente mencionados son de naturaleza compleja y no afectan por igual a todas las funciones celulares. De hecho, hay datos que sugieren que podrían potenciar la estimulación de la proliferación celular inducida por EGF y acelerar la entrada en el ciclo celular (Zugaza, Casabiell et al. 1995).

1.9-Ciclo celular

El ciclo celular está implicado en el crecimiento y proliferación celular, el desarrollo del organismo, la regulación de la reparación de alteraciones en el DNA, la hiperplasia de tejidos en respuesta a una lesión y en enfermedades como el cáncer. Se puede dividir en dos fases: interfase y mitosis. La interfase consta de la fase de síntesis (S), y de las fases G1 y G2 (intervalos entre la fase de síntesis de DNA y la mitosis). La fase G1, corresponde al intervalo (gap) entre la mitosis y el comienzo de la replicación del DNA. Durante esta fase, la célula es metabólicamente activa y está creciendo; se prepara para la síntesis de DNA. A esta fase, le sigue la fase S, en la cual se replica el DNA, por lo que la célula tiene en este momento un contenido de DNA entre $2n$ y $4n$. Tras finalizar la síntesis del DNA, entra en la fase G2 (gap 2). Durante esta fase prosigue el crecimiento de la célula y se sintetizan proteínas necesarias para la mitosis. En la fase de mitosis (fase M), se separan los cromosomas hijos y se produce la división celular (citocinesis).

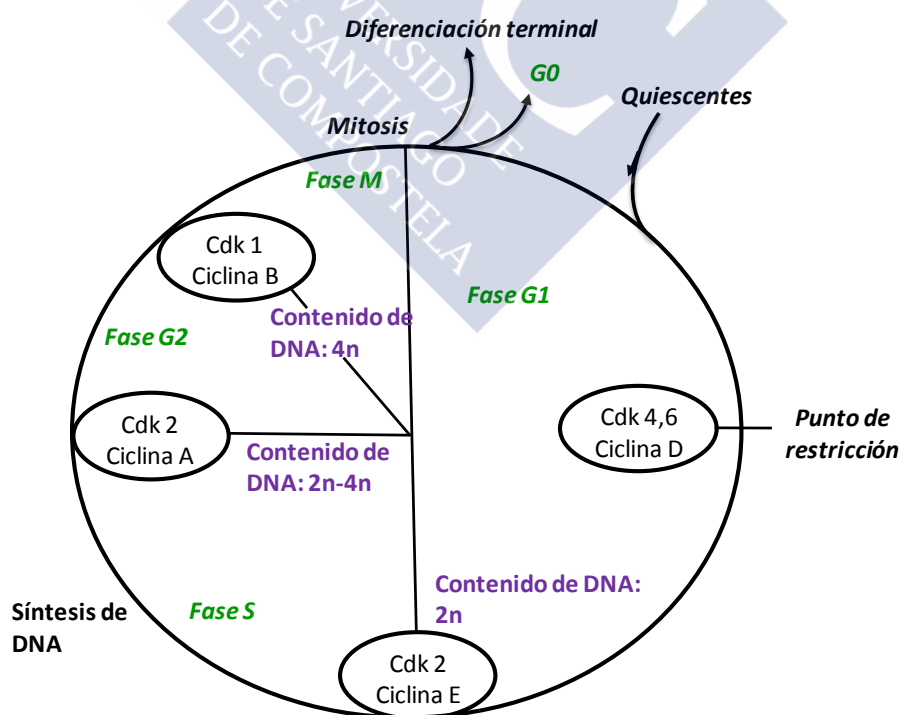


Figura 7: Progresión del ciclo celular. Cdk: cinasas dependientes de ciclinas. Modificado de (Schafer 1998).

La progresión de las células a través del ciclo celular (Figura 7) está regulada por señales extracelulares del medio y por señales internas que supervisan y coordinan los procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular.

▪ Control intracelular del ciclo celular

En el control interno del ciclo celular participan los complejos CDK-ciclina (permiten el progreso del ciclo celular), y proteínas inhibidoras de los complejos CDK-ciclinas: p16, p21, p27, y p53. Las CDK (quinasas dependientes de ciclinas) fosforilan elementos claves de la progresión del ciclo celular. Para ser activas requieren unirse a ciclinas, proteínas que experimentan un ciclo de síntesis y degradación en cada ciclo celular, produciendo variaciones cíclicas en el ensamblaje y activación de los complejos CDK-ciclinas; esta activación sucesiva desencadena los acontecimientos del ciclo celular. Casi al final de G1 se encuentra el punto de restricción que está regulado por la pRb (proteína del Retinoblastoma). En presencia de factores de crecimiento apropiados, la células atraviesan dicho punto y entran en la fase S. Una vez rebasado dicho punto, quedan determinadas a seguir a través del ciclo celular, incluso en ausencia de estimulación por factores de crecimiento. Cuando los factores de crecimiento no están disponibles en G1, la progresión del ciclo celular se para en el punto de restricción, y entran en G0 (abandonan el ciclo celular y entran en un período de latencia), hasta que son inducidas a proliferar por factores de crecimiento o por otras señales adecuadas. Los responsables del paso a través de este punto son los complejos CDK 4 y CDK 6 – ciclina D; las CDK fosforilan a la proteína Rb, con lo que se libera el factor de transcripción E2F del complejo Rb-E2F, y se estimula la síntesis de CDK2 y ciclina E (necesarios para el progreso de G1-S), proteínas necesarias para la síntesis de DNA, y del propio E2F inactivando aún más Rb y disminuyendo la concentración de p27 (Figura 8).

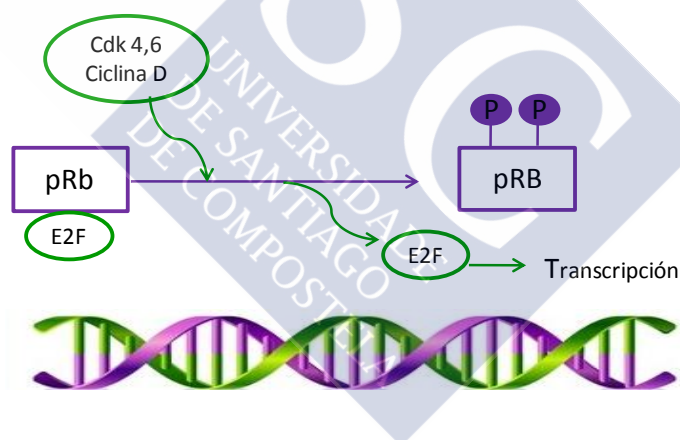


Figura 8: Activación del E2F por los complejos CDK-ciclina. Cdk: cinasas dependientes de ciclinas; E2F: factor de transcripción E2F; P: fosforilación. Modificado de (Schafer 1998).

Si en el medio extracelular no existen suficientes mitógenos, factores de crecimiento y/o nutrientes, p16 inhibe la formación de complejos CDK 4,6-ciclina D, ya que se interpone entre la CDK y la ciclina e inhibe su unión. La p27 suprime la actividad de los complejos CDK-ciclinas activos en los primeros puntos de control, y además ayuda a retirar la célula del ciclo celular llevándola a G0. Después del punto de restricción se encuentran 3 puntos de control, diseñados para evitar que las células se puedan replicar si están dañadas, en cuyo caso se detiene el ciclo celular y se activan mecanismos de reparación del DNA que, si fallan, inician el proceso de apoptosis. El primer punto de control se encuentra en G1 después del punto de restricción, y revisa que las condiciones del medio sean favorables para la proliferación (temperatura, presencia de nutrientes, sales, etc), que la célula haya crecido lo suficiente, y que el material genético esté intacto. En este punto participa el complejo CDK2-ciclina E; también inactiva a Rb, se libera E2F y se sintetizan las enzimas necesarias para comenzar la síntesis

de DNA en la fase S. La inhibición en este punto se produce por un aumento de la concentración de p53, la cual estimula la síntesis de p21 que se une a CDK2-ciclina E, e inhibe la acción del complejo (la fosforilación de pRb y la liberación del E2F), deteniendo el ciclo celular en G1 e induciendo la apoptosis. El segundo punto de control se encuentra al final de G2. Se encarga de revisar que el material genético se haya duplicado completamente, que no contenga errores y que el medio extracelular sea adecuado. Los complejos CDK1-ciclina A y ciclina B permiten el paso a través de este punto, al actuar en las primeras subfases de la mitosis: inducen el ensamblaje del huso mitótico, y aseguran que los cromosomas replicados se unan al huso mitótico. En este punto también participa p53. Esta proteína detecta alteraciones en el DNA y desencadena la activación de p21, que inhibe los complejos CDK1,2,4 y 6-ciclina. El tercer punto de control se localiza en la fase M, entre la metafase y anafase. Se encarga de revisar que todos los cromosomas se hayan unido al huso mitótico. Si detecta que uno de los cinetocoros no se encuentra unido, manda una señal negativa al sistema de control, bloqueando la activación de proteínas implicadas en la separación de las cromátidas hermanas. Inactiva específicamente el complejo promotor de la anafase (APC)-cdc 20, impidiendo de esta forma la separación de las cromátidas hermanas y que las células hijas reciban una dotación cromosómica incorrecta.

▪ *Control extracelular del ciclo celular*

La división celular es un proceso controlado para que las células se dividan sólo cuando se requieran más células para el crecimiento de los tejidos, o para reponer células perdidas. Así, para se produzca la entrada en el ciclo celular se requiere, aparte de unos niveles adecuados de nutrientes, de la activación de las vías anteriormente mencionadas a través de moléculas de señalización extracelular de naturaleza proteica secretadas por otras células, por proteínas unidas a la superficie de otras células o por la matriz extracelular. Estas proteínas se dividen en 3 grupos: mitógenos, factores de crecimiento y factores de supervivencia.

Los mitógenos son proteínas que estimulan la división celular, contrarrestando los mecanismos intracelulares que bloquean su progresión. Actúan en la fase G1 para permitir la entrada de la célula en la fase S. Se unen a receptores de membrana con actividad tirosín-quinasa, los cuales activan a la proteína G monomérica Ras cambiándola de su estado unido al GDP por GTP (activación). Esta activación desencadena una cascada de fosforilaciones a través de las proteínas MAPK (quinasas activadas por mitógenos), que provoca un aumento de la proteína reguladora de genes Myc; ésta aumenta la transcripción de genes necesarios para la entrada en la fase S. Myc también tiene un papel clave en la estimulación de la transcripción de los genes que inducen crecimiento celular.

Los factores de crecimiento estimulan el crecimiento celular (aumento de la masa celular). Se unen a receptores de la superficie celular, y activan vías de señalización intracelulares que aumentan la velocidad de síntesis de proteínas y de otras macromoléculas, e inhiben su degradación, provocando así su acumulación. La principal vía de señalización activada por los receptores de los factores de crecimiento implica la enzima fosfatidil inositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) (se activa por receptores con actividad tirosín-quinasa y por algunos asociados a proteínas G). La PI 3-quinasa cataliza la fosforilación de fosfatidil inositol de la membrana en posición 3, generando PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃. La activación de la PI 3-quinasa, conduce a la activación de varias quinasas, incluyendo la quinasa S6, la cual fosforila la proteína ribosómica S6, lo que incrementa la traducción de un subgrupo de mRNA que codifica proteínas ribosómicas y otros componentes ribosómicos. En consecuencia, la síntesis proteica aumenta.

Algunas proteínas de señalización extracelular pueden actuar como mitógenos y como factores de crecimiento, debido al solapamiento de las vías de señalización que controlan estos dos procesos; la proteína Ras puede activar la vía PI 3-quinasa estimulando el crecimiento celular y la vía de las MAPK induciendo la progresión del ciclo celular. Los factores extracelulares que actúan como factores de crecimiento y como mitógenos, contribuyen a que las células mantengan un tamaño adecuado a medida que proliferan.

Los factores de supervivencia promueven la supervivencia celular por supresión de la apoptosis. Se cree que las señales de supervivencia procedentes de células adyacentes regulan el número de células en los tejidos. Estos factores se unen a receptores de la superficie celular, lo que conduce a la activación de vías de señalización que mantienen inhibido el programa de muerte celular, regulando con frecuencia a los miembros de la familia de proteínas Bcl-2. Algunos factores hacen que aumente la síntesis de los miembros inhibidores de esta familia. Otros actúan inhibiendo la función activadora de la apoptosis de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (se unen a receptores de la superficie celular desencadenando la activación de varias proteína-quinasa, incluyendo la proteína-quinasa B (PKB), que fosforila e inactiva el miembro de la familia Bcl-2, Bad, inhibiendo la apoptosis). Algunos factores de supervivencia también actúan estimulando la actividad de las IAP (inhibidores de la apoptosis) mediante la activación de las MAPK (Alberts, Johnson et al. 2002).

Resulta interesante resaltar que, a pesar de la alteración producida por el ácido oleico en la señalización de transmembrana del mitógeno EGF en fibroblastos, (inhibe el aumento de $[Ca^{2+}]_i$, del potencial de membrana y la generación de $Ins(1,4,5)P_3$), el ácido oleico acelera la entrada de las células tratadas con EGF en el ciclo celular y potencia la acción mitógena del EGF, pero este efecto del ácido oleico parece que es compensado con el tiempo, de forma que no modifica la proliferación celular (Zugaza, Casabiell et al. 1995).

1.10-Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, ocurre normalmente durante el desarrollo y la edad adulta, como un mecanismo de homeostasis que permite mantener las poblaciones celulares en los tejidos. Es el sistema fisiológico utilizado para la eliminación celular, que interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas. También está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades incluyendo la aterosclerosis y sus complicaciones (Mallat and Tedgui 2000).

Las células apoptóticas presentan como características morfológicas la formación de vesículas en la membrana, retracción celular y condensación de la cromatina. Bioquímicamente, estas alteraciones se asocian con la translocación de la fosfatidilserina a la cubierta externa de la membrana plasmática y con la activación de una endonucleasa que divide el DNA genómico en múltiples fragmentos internucleosómicos (Blanco-Colio, Hernández-Presa et al. 2000). Estos procesos morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis, están mediados por efectores de muerte celular, las caspasas. Éstas se sintetizan en la célula como precursores inactivos o procaspasas, los cuales son activados generalmente por escisión en residuos de ácido aspártico por otras caspasas. La activación de las procaspasas puede inducirse desde el exterior de la célula a través de los receptores de señales de muerte de la superficie celular. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores del TNF (factor de necrosis tumoral): receptor Fas (Fas/CD95) y receptor del TNF (TNFR). Los ligandos de estos receptores son el ligando Fas y TNF (pertenecen a la familia del TNF). Estos receptores normalmente se encuentran en forma trimérica, de forma que la unión de los ligandos induce su agregación (Schmitz, Kirchhoff et al. 2000; Vincenz 2001; Thorburn 2004). El receptor activado (Figura 9) recluta moléculas adaptadoras FADD (Fas-associated death domain) (Ashkenazi and Dixit 1998); éstas contienen un dominio de muerte que se une al del receptor (Zeihner, Fisslthaler et al. 1995), y un dominio efector de muerte que se une a un dominio análogo de la procaspasa 8, la cual sufre una activación autocatalítica convirtiéndose en caspasa 8 activa (Muzio, Chinnaiyan et al. 1996), ésta rompe y activa otras caspasas efectoras como la 3, 6 y 7, las cuales constituyen la principal actividad caspasa en las células apoptóticas (Degterev, Boyce et al. 2003).

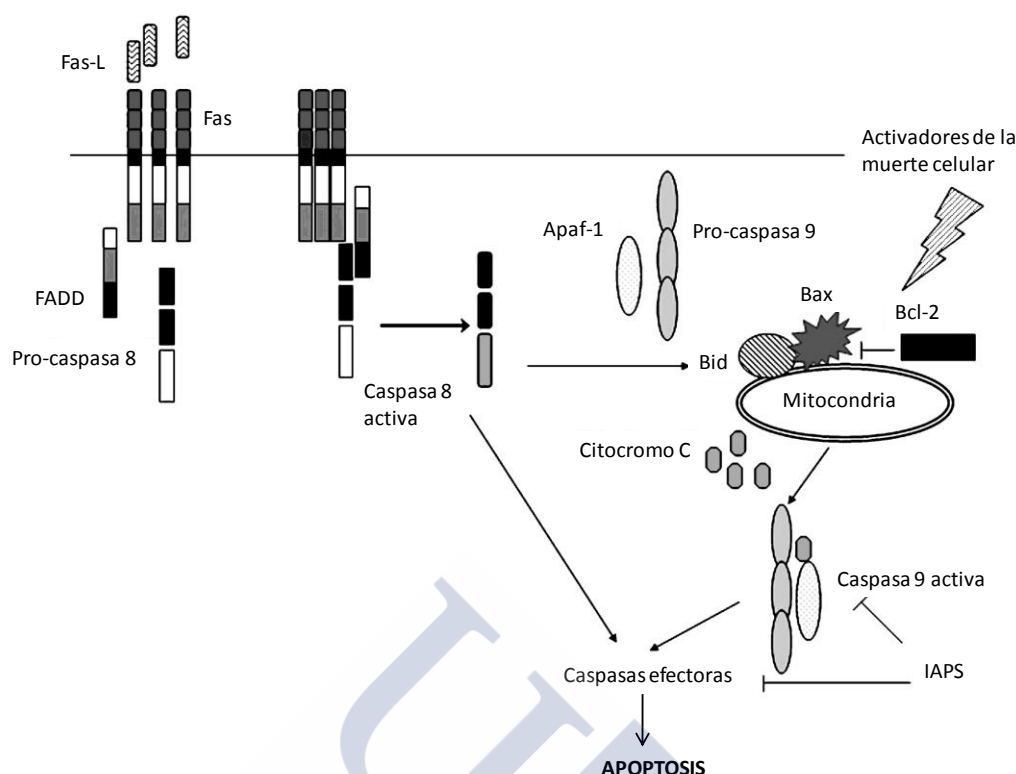


Figura 9: Vías de señalización de la apoptosis: vía del receptor de muerte (TNF o ligando Fas/FADD/caspasa 8) y vía mitocondrial (familia Bcl-2/citocromo C/Apaf-1/caspasa 9) (Stoneman and Bennett 2004).

La activación de las procaspasas también se puede producir desde el interior de la célula. Esta vía es dependiente de la liberación de citocromo C de la mitocondria al citoplasma. Una vez liberado se asocia con Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) y con la procaspasa 9, formándose un complejo denominado apoptosoma. El Apaf-1 transforma la procaspasa 9 en la forma activa, se libera del apoptosoma y activa las caspasas 3, 6 y 7 que provocan la apoptosis. La liberación del citocromo C está mediada por las proteínas de la familia Bcl-2: los miembros antiapoptóticos (Bcl-2 y Bcl-xL) bloquean la liberación del citocromo C, mientras que los proapoptóticos (Bax, Bim, Bid, Bad y Bak) y la p53 la inducen (Stoneman and Bennett 2004). La apoptosis también está regulada intracelularmente a través de IAPs (inhibidores de la apoptosis). Estas proteínas inhiben la apoptosis de dos formas: se unen a algunas procaspasas impidiendo su activación y se unen a las caspasas inhibiendo su actividad. Cuando se libera el citocromo C de las mitocondrias para activar a Apaf-1, las mitocondrias también liberan una proteína que bloquea las IAPs, aumentando así la eficacia del proceso de activación de la muerte celular (Alberts, Johnson et al. 2002).

La concentración de Ca^{+2} intracelular juega un importante papel en la patogénesis de la apoptosis (McConkey and Orrenius 1996). Muchos estudios han demostrado que la inducción de la apoptosis, se asocia con un aumento de Ca^{+2} intracelular: los bloqueantes de canales de calcio inhiben la apoptosis (Martikainen and Isaacs 1990), los ionóforos de Ca^{+2} desencadenan apoptosis en diversos tipos celulares (Kaiser and Edelman 1978; Wyllie, Morris et al. 1984; Martikainen and Isaacs 1990), los agentes quelantes de Ca^{+2} inhiben la activación de las caspasas, la fragmentación de DNA y la muerte celular (McConkey and Orrenius 1996a). El aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular puede conducir a la activación de quinasas dependientes de Ca^{+2} o fosfatasa, con la consiguiente activación de genes relacionados con el proceso de apoptosis. El incremento de los niveles de Ca^{+2} intracelular, también provoca un aumento de la captación de Ca^{+2} por la mitocondria, por lo que aumenta la liberación de citocromo C y la activación de la vía de apoptosis mitocondrial (Szabadkai and Rizzuto 2004).

Como se comentó anteriormente, los ácidos grasos *cis*-monoinsaturados, pero no los *trans*-insaturados ni los saturados, inhiben el aumento de Ca^{+2} intracelular que se produce tras la activación de la vía del AMPc-PKA en células somatotropas (Perez, Camina et al. 1998), y del IP_3 - Ca^{+2} /DAG-PKC en fibroblastos (Casabiell, Pandiella et al. 1991) y células somatotropas (Perez, Casabiell et al. 1997). Además, el ácido oleico inhibe directamente los canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes de la membrana plasmática (Perez, Camina et al. 1997a). Este efecto sobre la movilización de Ca^{+2} hace pensar que los ácidos grasos tipo A puedan tener un efecto protector frente a la apoptosis celular.

1.11-Apoptosis en el endotelio vascular

En condiciones normales, las células endoteliales tienen un índice de recambio muy bajo; permanecen viables hasta 20 años. Esto indica que la apoptosis es relativamente rara en condiciones fisiológicas. En el endotelio intacto la proliferación celular es inhibida por el contacto de las células endoteliales, por lo que el incremento del recambio celular es consecuencia de la previa muerte celular. El índice de recambio aumenta significativamente en las zonas donde el flujo sanguíneo es lento o turbulento. En estas zonas, se observa un mayor número de células en apoptosis, y se desarrollan con mayor frecuencia las lesiones de aterosclerosis (Davies, Remuzzi et al. 1986). Esto sugiere un mecanismo de relación entre el recambio endotelial, y la susceptibilidad al desarrollo de la placa aterosclerótica. Además de la asociación de la apoptosis con el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, la apoptosis también juega un importante papel en eventos críticos de la progresión de la enfermedad, en los cuales la erosión de la placa y la formación del trombo conduce a la oclusión del vaso y al infarto. Las células que sufren apoptosis poseen actividad procoagulante al adherirse a ellas las plaquetas (Bombeli, Karsan et al. 1997; Bombeli, Schwartz et al. 1999), y los segmentos del vaso desnudos facilitan la agregación de plaquetas y el vasoespasmo, lo cual puede conducir a trombosis coronaria incluso en ausencia de rotura de la placa (Farb, Burke et al. 1996).

La superficie luminal de las células endoteliales está expuesta a moléculas proinflamatorias y a factores de riesgo proaterogénicos que están asociados con el desarrollo y/o progresión de la aterosclerosis, los cuales son capaces de inducir apoptosis en las células endoteliales. La citoquina proinflamatoria $\text{TNF}\alpha$ (Robaye, Mosselmans et al. 1991), altas concentraciones de glucosa como las encontradas en la diabetes mellitus (Ho, Liu et al. 2000; Baumgartner-Parzer and Waldhausl 2001), las lipoproteínas de baja densidad (LDL oxidadas, Lp(a) oxidadas) las cuales se ha demostrado que juegan un importante papel en la aterogénesis, desencadenan apoptosis en células endoteliales (Dimmeler, Haendeler et al. 1997a; Harada-Shiba, Kinoshita et al. 1998; Li, Yang et al. 1998; Sato, Kokame et al. 1998; Walter, Haendeler et al. 1998; Galle, Schneider et al. 1999; Heermeier, Schneider et al. 1999). El incremento del estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de disfunción endotelial y en la progresión de la aterogénesis, y se ha demostrado que las ROS inducen apoptosis en las células endoteliales (Hermann, Zeiher et al. 1997; Dimmeler, Hermann et al. 1999; Vissers, Pullar et al. 1999). La angiotensina II (Dimmeler, Rippmann et al. 1997; Li, Tomson et al. 1999; Li, Yang et al. 1999) y la adrenalina (Romeo, Li et al. 2000) se asocian con el desarrollo de la aterosclerosis y provocan apoptosis en células endoteliales. Con respecto al carácter inflamatorio de la aterosclerosis, ligandos del PPAR (receptor activado por proliferadores de peroxisomas) (Bishop-Bailey and Hla 1999), el cual está expresado en las lesiones ateroscleróticas, inducen apoptosis de las células endoteliales. Las endotoxinas bacterianas (Buchman, Abello et al. 1993; Haendeler, Zeiher et al. 1996; Haimovitz-Friedman, Cordon-Cardo et al. 1997; Choi, Wong et al. 1998) también desencadenan apoptosis de las células endoteliales, sugiriendo relación entre la infección y la disfunción endotelial. Las LDL nativas a concentraciones aterogénicas, también promueven apoptosis de las células endoteliales (Badimon and Martinez-Gonzalez 2002). En cuanto a la vía de señalización de la apoptosis endotelial, se ha demostrado que diversos estímulos proapoptóticos activan las caspasas y en particular la caspasa-3. Al inhibir la caspasa-3, se

bloquea la inducción de la apoptosis desencadenada por diversos estímulos (Kondo, Kondo et al. 1996; Mitra, Kim et al. 1998; Farber, Kitzmiller et al. 1999; Wang, Verna et al. 1999).

En contraste con lo anterior, los factores antiaterogénicos protegen las células endoteliales de la apoptosis. El flujo laminar, que se considera uno de los factores endógenos de mayor poder antiaterogénico; protege a las células endoteliales inhibiendo la apoptosis inducida por diversos estímulos como la depleción de factores de crecimiento (Dimmeler, Haendeler et al. 1996), el TNF α (Dimmeler, Haendeler et al. 1997), el H₂O₂ (Hermann, Zeiher et al. 1997) y las LDL oxidadas (Dimmeler, Hermann et al. 1999). Esta inhibición está mediada por la liberación de NO, el cual inhibe la cascada de las caspasas (Dimmeler, Haendeler et al. 1997). Otros factores antiaterogénicos, como los antioxidantes, previenen la apoptosis endotelial inducida por el TNF α , las LDL oxidadas y las endotoxinas (Abello, Fidler et al. 1994; Haendeler, Zeiher et al. 1996; Dimmeler, Haendeler et al. 1997a). Los estrógenos también inhiben la inducción de la apoptosis en células endoteliales (Spyridopoulos, Sullivan et al. 1997).





OBJETIVOS



2-OBJETIVOS

- Estudiar las características básicas de morfología y proliferación de la línea celular MS-1, y su posible utilidad como modelo de células endoteliales inmortalizadas.
- Determinar el efecto de diferentes ácidos grasos C18 sobre el ciclo celular en células MS-1, especialmente su impacto sobre la fase S y sobre la apoptosis.
- Determinar el efecto de diferentes ácidos grasos C18 sobre la fluidez de membrana en células MS-1.
- Analizar la relación entre los efectos biológicos de los ácidos grasos utilizados y su conformación espacial.







MATERIAL Y MÉTODOS



3-MATERIAL Y METODOS

3.1-Cultivos celulares

Para la realización del presente trabajo, se utilizó la línea celular MS-1 (MILE SVEN 1), que es una línea de células endoteliales pancreáticas murinas (C57BL/6) transformadas con el "SV40 large T antigen" (Jat and Sharp 1989) obtenida en 1994. Esta línea se usa como un modelo de endotelio, ya que mantiene muchas propiedades de las células endoteliales, como captación de LDL acetilada, expresión de receptores de VEGF y de antígenos relacionados con el Factor VIII (Arbiser, Moses et al. 1997).

Las células MS-1, se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, SIGMA), suplementado con bicarbonato sódico (3.7 g/l, Panreac) glutamina (2 mM, SIGMA), piruvato sódico (1 mM, SIGMA), penicilina (100 U/ml, SIGMA), estreptomycin (100 µg/ml, SIGMA) y suero fetal de ternera (FCS, 10%, v/v, Gibco), sobre placas de petri desechables de 100 mm de diámetro, hasta alcanzar una confluencia en torno al 90%, momento en el cual se subcultivaron. Para ello, las monocapas se lavaron dos veces con 2 ml de solución de HAM [solución I de Ham (Ham, RG; McKeehan, WL) sin glucosa, conteniendo en mM/l: KCl (Panreac), 3; NaCl (Panreac), 122; Na_2HPO_4 (Panreac), 1; HEPES (SIGMA) 30; pH 7.4, ajustado con NaOH (SIGMA)] libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , con objeto de eliminar los iones divalentes y las proteínas séricas que pudiesen inhibir la acción de la tripsina. A continuación, se añadieron a cada placa 2 ml de la misma solución, suplementada con EDTA (0.9 mM, SIGMA) y tripsina (0.1%, SIGMA), que son retirados inmediatamente, dejando actuar tan sólo la película de solución de tripsina que permanece sobre las células. Al cabo de 5 minutos puede apreciarse a simple vista el despegamiento de la monocapa, proceso que se acelera si se dan pequeños golpes en el borde de las placas. Las células se recogieron en medio de cultivo completo, se diluyeron, y sembraron en una relación 1:5 a 1:20, dependiendo del experimento.

Todos los cultivos fueron mantenidos en condiciones estériles a 37° C, en un incubador de CO_2 con autocalibrado automático periódico, bajo una atmósfera humidificada (95 % de saturación) con 5% CO_2 /95% aire.

3.2-Determinación espectrofluorimétrica de la proliferación celular

La proliferación celular, se determinó mediante cuantificación de DNA con Hoechst 33258 (SIGMA). El Hoechst 33258, es un colorante fluorescente que se excita en la región próxima al UV (350 nm) y emite a 500 nm. Se une específicamente a regiones del DNA de doble cadena ricas en A-T, provocando un aumento de la fluorescencia y cambiando el máximo de emisión de 500 nm a 460 nm. La fluorescencia medida es proporcional a la cantidad de DNA. A diferencia con otros métodos de cuantificación del DNA, el RNA, DNA simple hebra, las proteínas y buffers de extracción, no interfieren en la señal.

Estos experimentos fueron realizados en placas de 24 pocillos, para las cuales se determinó que el número de células a sembrar por pocillo para obtener el máximo crecimiento era de 20.000 células/pocillo. Veinticuatro horas después de la siembra se lavaron 2 veces con DMEM sin FCS y se serodeprivaron durante 24 horas con DMEM 0,5% FCS. Tras la serodeprivación, se lavaron 3 veces con DMEM sin FCS, se trataron con ácido oleico 10 µM (SIGMA) diluido en DMEM sin FCS o vehículo y se incubaron durante 1 hora a 37° C bajo una atmósfera de 95% aire/5% CO_2 . Posteriormente en la placa control y en la placa tratada con ácido oleico, se añadió FCS (hasta alcanzar una concentración final de 0,5%, 2,5%, 5%, 10% FCS) y los factores de crecimiento VEGF 50 nM (Becton Dickinson) y Endotelina-1 75 nM (SIGMA) con 0,5% FCS (concentraciones a las que se obtiene la máxima proliferación) en los correspondientes pocillos y se incubó durante 48 h. Finalmente, se lavaron las células con PBS [NaCl 137.0 mM, KCl 2,7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8 mM (Panreac), KH_2PO_4 1,5 mM (Panreac), pH=7.4], se añadió 0,5 ml de tampón de lisis [NaCl 150 mM, TRIS HCl 25 mM pH=7,8 (SIGMA), EDTA 1 mM, SDS 1%(SIGMA)] a cada pocillo, se dejó actuar 5 minutos y se recogieron los

lisados que fueron guardados a -20°C hasta su análisis. La Figura 10 resume las condiciones ensayadas en este experimento:

Placa control

	A FCS 0,5%	B FCS 2,5%	C FCS 5%	D FCS 10%	E VEGF 50nM	F ET-1 75nm	
1	FCS 0,5% Vehículo	FCS 2,5% Vehículo	FCS 5% Vehículo	FCS 10% Vehículo	FCS 0,5% Vehículo VEGF 50nM	FCS 0,5% Vehículo ET-75 nM	1
2	FCS 0,5% Vehículo	FCS 2,5% Vehículo	FCS 5% Vehículo	FCS 10% Vehículo	FCS 0,5% Vehículo VEGF 50nM	FCS 0,5% Vehículo ET-75 nM	2
3	FCS 0,5% Vehículo	FCS 2,5% Vehículo	FCS 5% Vehículo	FCS 10% Vehículo	FCS 0,5% Vehículo VEGF 50nM	FCS 0,5% Vehículo ET-75 nM	3
4	FCS 0,5% Vehículo	FCS 2,5% Vehículo	FCS 5% Vehículo	FCS 10% Vehículo	FCS 0,5% Vehículo VEGF 50nM	FCS 0,5% Vehículo ET-75 nM	4
	A	B	C	D	E	F	

Tratamiento con ácido oleico

	A FCS 0,5%	B FCS 2,5%	C FCS 5%	D FCS 10%	E VEGF 50nM	F ET-1 75nm	
1	FCS 0,5% AO 10 μM	FCS 2,5% AO 10 μM	FCS 5% AO 10 μM	FCS 10% AO 10 μM	FCS 0,5% AO 10 μM VEGF 50nM	FCS 0,5% AO 10 μM ET-75 nM	1
2	FCS 0,5% AO 10 μM	FCS 2,5% AO 10 μM	FCS 5% AO 10 μM	FCS 10% AO 10 μM	FCS 0,5% AO 10 μM VEGF 50nM	FCS 0,5% AO 10 μM ET-75 nM	2
3	FCS 0,5% AO 10 μM	FCS 2,5% AO 10 μM	FCS 5% AO 10 μM	FCS 10% AO 10 μM	FCS 0,5% AO 10 μM VEGF 50nM	FCS 0,5% AO 10 μM ET-75 nM	3
4	FCS 0,5% AO 10 μM	FCS 2,5% AO 10 μM	FCS 5% AO 10 μM	FCS 10% AO 10 μM	FCS 0,5% AO 10 μM VEGF 50nM	FCS 0,5% AO 10 μM ET-75 nM	4
	A	B	C	D	E	F	

Figura 10: Diseño experimental de la determinación del efecto del ácido oleico sobre la proliferación celular .

La determinación fluorimétrica de DNA, se hizo siguiendo el protocolo de Labarca & Paigen modificado (Labarca and Paigen 1980). Se preparó una dilución de trabajo de Hoechst 33258 2 mg/ml en TNE 1X (solución stock TNE 10X= Tris 100mM (SIGMA), NaCl 2.0M, EDTA 10mM; pH 7.4), y se pipetearon 10 μl de lisado celular (una vez descongelado y homogeneizado) en 2 ml de la dilución anterior. Después de incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se midió la fluorescencia de cada muestra en un espectrofluorímetro Shimadzu RF 5000 seleccionando como longitud de onda de excitación y emisión 356 nm y 458 nm respectivamente. La determinación de la concentración de DNA de cada muestra se realizó por extrapolación a partir de una recta patrón que se obtiene utilizando DNA de esperma de salmón (SIGMA). A diluciones seriadas de este DNA se agregó la misma cantidad de Hoechst que a los lisados celulares y se determinó su fluorescencia a fin de obtener la curva patrón. Este método se utilizó teniendo en cuenta que la concentración de las muestras incógnita estaba comprendido dentro del rango de concentraciones de DNA patrón utilizado para la realización de la recta patrón. Se descartaron los experimentos en los que le R de la recta patrón fue menor a 0.98.

3.3-Estudio del ciclo celular y la apoptosis por citometría de flujo

El análisis del ciclo celular y de la apoptosis de células MS-1 se realizó por citometría de flujo, para lo cual las células se tiñeron con ioduro de propidio (IP); un marcador fluorescente que se excita a una longitud de onda de 488 nm, y una vez unido al ácido nucleico emite fluorescencia a 620 nm. El IP se une estequiométricamente al DNA, lo que permite relacionar directamente la cantidad de fluorescencia medida a 620 nm con el contenido de DNA. Las moléculas de IP, se intercalan entre los pares de bases de los ácidos nucleicos, tanto del DNA

como del RNA, por lo que a fin de eliminar la interferencia generada por el RNA, las células se tratan con RNAasa de forma que la cantidad de colorante unido que se obtiene es proporcional al contenido de DNA. En la fase G0 (reposo) y G1 (presintética), la célula tiene un contenido diploide ($2n$) de DNA. Durante la fase S o de síntesis, la célula duplica su contenido en DNA convirtiéndose en tetraploide (paso de $2n$ a $4n$). En la fase G2 o postsintética, y al inicio de la mitosis, la célula mantiene este doble contenido de ADN hasta que se divide en dos hijas de contenido diploide. Los análisis de ciclo celular, se representan en forma de histogramas de intensidad de fluorescencia de la sonda de DNA, la cual es proporcional al contenido de DNA. La región que se encuentra en los canales más bajos del espectro, llamada subG0, corresponde a células con el ADN fragmentado, lo cual puede correlacionarse con una fase tardía de apoptosis; células con un contenido de DNA inferior a $2n$ (Darzynkiewicz, Bruno et al. 1992). Al final de esta región, se encuentra el pico G0/G1 correspondiente a células con contenido diploide de ADN. La siguiente región no muestra un pico, sino un intervalo de canales, que corresponde a una cantidad de DNA variable entre $2n$ y $4n$. Esta región, se asocia a células en diferentes etapas de la fase de síntesis S. Seguidamente se encuentra el pico G2/M, situado en un canal doble del correspondiente al pico G0/G1, ya que se debe a células tetraploides (Figura 11).

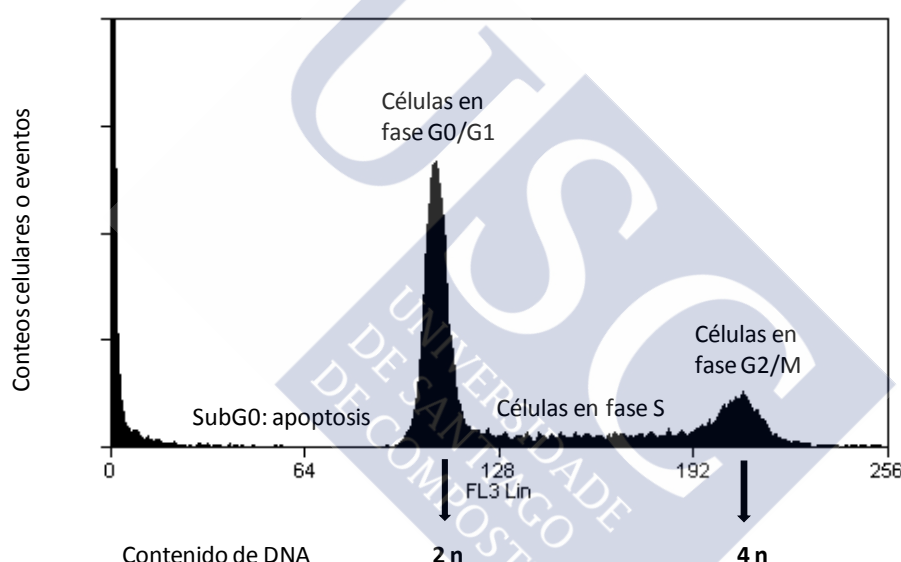


Figura 11: Histograma de intensidad de fluorescencia de la sonda de DNA.

Para el procesamiento de muestras por citometría de flujo, se usó el protocolo de Darzynkiewicz et al., 1992. Las células fueron cultivadas en placas de 100 mm de diámetro a partir de cultivos al 90% de confluencia, sembrando para cada tiempo del experimento el número de células necesario para obtener al final del mismo 1-2 millones de células/placa, concentración óptima para realizar la lectura en el citómetro de flujo. A las 24 h, las células se lavaron 2 veces con DMEM sin FCS, y se serodeprivaron mediante incubación en medio DMEM suplementado con un 0,5% de FCS durante 24 h. En estas condiciones, la falta de nutrientes provocó el arresto del ciclo celular, con lo que se consiguió sincronizar el cultivo celular. Se lavaron a continuación las monocapas 3 veces con DMEM sin FCS, se trataron con ácido oleico, ácido eláidico y ácido esteárico 10 μ M (SIGMA) ó vehículo y se incubaron durante 1 hora a 37° C bajo una atmósfera de 95% aire/5% CO₂. Se añadió posteriormente FCS hasta una concentración final de 10% (medio completo) o de 0.5% (medio restrictivo) y se prosiguió la incubación, tomándose muestras a las 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 horas. Se recogieron tanto las células en suspensión, como las adheridas a la placa, para lo cual las monocapas celulares se lavaron 2 veces con HAM suplementado con EDTA 0,9 mM y se tripsinizaron con HAM suplementado con EDTA 0,9 mM más tripsina 1mg/ml. Las células una vez despegadas, se

levantaron con 5 ml de DMEM 10% FCS y se lavaron 2 veces con PBS 1X suplementado con 0,1% BSA (SIGMA), mediante 2 centrifugaciones a $1.500 \times g$ durante 5 minutos. Posteriormente, se resuspendieron a 1,5 millones de células/ml y se fijaron con etanol 70% (Panreac) durante 1 hora a 4°C . Una vez fijadas se conservaron a -20°C hasta su análisis. Para ésto, se centrifugaron las células fijadas a $1.500 \times g$ durante 5 minutos para eliminar el etanol y se centrifugaron 2 veces más con PBS 1X suplementado con 0,1% BSA para lavarlas. Posteriormente se resuspendieron en 0,5 ml de PBS 1X 0,1% BSA y 0,5 ml buffer de extracción de DNA ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, $\text{pH}=7,8$). Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron las células a $1500 \times g$, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de IP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SIGMA), esta mezcla se suplementó con 50 μl de ARNasa A (10mg/ml, SIGMA). Las células se incubaron en esta solución durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se analizaron utilizando el citómetro de flujo Coulter® EPICS® XL™. La suspensión celular se inyectó en la cámara de flujo y se midió la fluorescencia emitida por el IP utilizando el filtro PB 620 (FL3). Las medidas fluorimétricas se analizaron a través de histogramas de intensidad de fluorescencia. Éstos permitieron establecer los porcentajes de la población celular que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular para cada tratamiento.

3.4-Determinación de la fluidez de membrana por espectroscopía de fluorescencia

El estudio de la fluidez de membrana se realizó por espectroscopía de fluorescencia midiendo la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario, es decir, con excitación y observación constantes.

Las membranas lipídicas no presentan fluorescencia natural, por lo que para el estudio de las propiedades de la bicapa, es necesario utilizar sondas fluorescentes que se inserten en ellas. Se utilizó como sonda el DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno, SIGMA), el cual se sitúa en la región apolar de la bicapa lipídica adoptando una orientación paralela o perpendicular a las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.

La anisotropía de fluorescencia mide la difusión rotacional de la sonda, la cual va a depender de la fluidez de la membrana y se basa en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada. Refleja la capacidad de la sonda de despolarizar el plano de luz polarizada de la fuente de excitación. Esta despolarización ocurre entre la absorción de luz polarizada y la emisión de fluorescencia. Cuando una población de fluoróforos se excita con luz linealmente polarizada, la probabilidad de excitación de una molécula de fluoróforo depende de la orientación de su momento dipolar de absorción con respecto a la dirección del vector campo eléctrico de la luz de excitación. De este modo, se excitan preferentemente las moléculas de fluoróforo cuyo momento de transición está orientado en una dirección próxima a la del vector campo eléctrico de la luz de excitación, lo que se conoce como fotoselección (Lakowicz 1999). La excitación selectiva da lugar a una población de fluoróforos parcialmente orientada y por lo tanto a una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada. La velocidad con la que un fluoróforo es capaz de rotar durante su tiempo de vida media en el estado excitado determinará su anisotropía la cual está directamente relacionada con la polarización. Esta característica puede ser directamente relacionada con la fluidez de las bicapas lipídicas, ya que alteraciones de la rigidez de la bicapa lipídica, provocan alteraciones en el movimiento rotacional de la sonda y como consecuencia se modifica la anisotropía (Sousa, Nunes et al. 2008). La relación entre anisotropía y fluidez de la membrana es inversa; a mayor anisotropía, menor fluidez de la membrana lipídica. Las moléculas de fluoróforo orientadas paralelamente a la radiación de excitación polarizada verticalmente, se excitan. En una membrana en estado gel, la sonda no puede rotar libremente durante su tiempo de vida media en estado excitado debido a que existen muchas interacciones entre las cadenas acilos de los fosfolípidos, por lo que van a emitir luz polarizada. Sin embargo cuando la luz polarizada excita la sonda insertada en una membrana fluida, debido a que las interacciones entre las cadenas acilos de los fosfolípidos son reducidas, éstas presentan mayor movimiento y la sonda insertada en la

membrana rota durante su tiempo de vida en estado excitado, disminuyendo la emisión de luz polarizada y la anisotropía.

Para el estudio de la fluidez de membrana de las células MS-1, éstas fueron cultivadas en placas de 100 mm de diámetro. Al alcanzar una confluencia de aproximadamente el 90%, se lavaron 2 veces con HAM suplementado con EDTA 0,9 mM y se tripsinizaron. Una vez despegadas, se levantaron con 5 ml de DMEM suplementado con 10% FCS. Se lavaron 3 veces con PBS 1X, mediante 3 centrifugaciones a 1.500 x g durante 5 minutos. Posteriormente se resuspendieron en PBS 1X a una concentración de 1.000.000 células/ml y se añadió la sonda DPH disuelta en tetrahidrofurano (SIGMA) a una concentración final 1 μ M. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se transfirieron 2 ml de la suspensión de células a una cubeta de cuarzo y se midió la anisotropía a 37°C bajo agitación constante en el espectrofluorímetro PerkinElmer LS 55 utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 425 nm. La temperatura de la cámara de medición se equilibró durante los 10 minutos anteriores a la recogida de los datos de fluorescencia, que se realizó durante un intervalo de 0-900 y 0-1.500 segundos, dependiendo del experimento como se explica más abajo. Las muestras se excitaron con luz polarizada verticalmente y se midieron las componentes de la intensidad de fluorescencia polarizada en las direcciones paralela ($I_{||}$) y perpendicular (I_{\perp}) al plano de polarización de la luz de excitación.

La anisotropía (r) de emisión de fluorescencia en estado estacionario de una solución excitada con luz polarizada linealmente se define por la siguiente ecuación (Lakowicz 1999):

$$r = \frac{I_{||} - GI_{\perp}}{I_{||} + 2GI_{\perp}}$$

$I_{||}$ y I_{\perp} corresponden a la intensidad de radiación polarizada vertical y horizontal, respectivamente, cuando la radiación de excitación es polarizada verticalmente. El factor G , es el factor de corrección para los fotomultiplicadores. Se usa para corregir la sensibilidad diferencial de los fotomultiplicadores a la luz polarizada vertical y horizontal. Es la razón entre la luz polarizada vertical y la luz polarizada horizontal cuando el haz de excitación de luz es polarizado horizontalmente. El factor de corrección es proporcional a la turbidez, y puede ser compensado usando un bajo número de células.

Para observar el efecto del ácido oleico, eláidico y esteárico sobre la fluidez, éstos se añadieron a la cubeta a los 300 segundos a concentración 5, 10, 15, 20, 25, 50 o 100 μ M y se midió la anisotropía durante 900 segundos. El análisis de los resultados se realizó calculando la variación de la anisotropía tras la adición de las diferentes concentraciones de ácidos grasos una vez estabilizada la señal, considerando como tal los datos recogidos de 600 a 900 segundos (Figura 12).

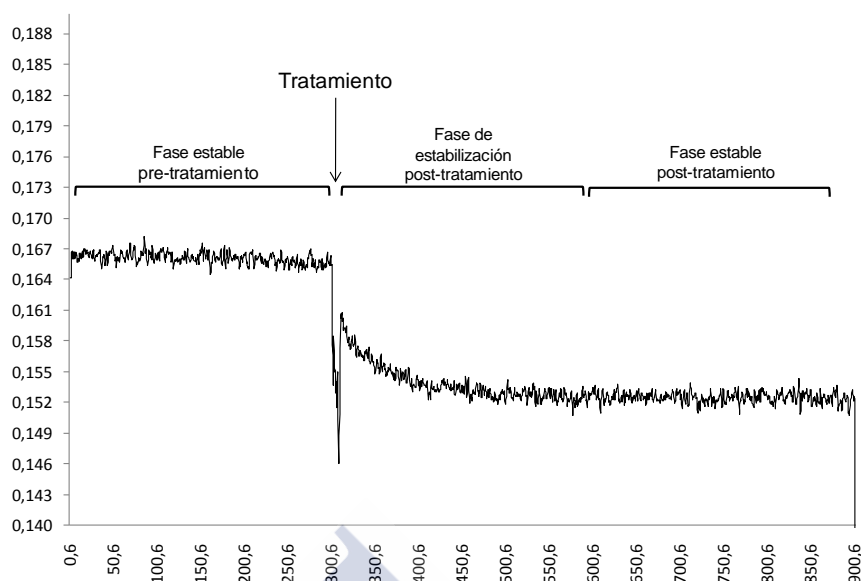


Figura 12: Anisotropía de fluorescencia en función del tiempo (segundos). Comprobada la estabilización de la señal a los 300 segundos se añade el tratamiento, después hay un período de estabilización de la señal que se descarta para el análisis de los resultados y éste se realiza con los datos obtenidos en la fase estable post-tratamiento.

La determinación del efecto del FCS sobre la fluidez la membrana de las células endoteliales MS-1 y la contribución de los lípidos presentes a dicho efecto, se realizó mediante la delipidación del FCS siguiendo el protocolo de Bill E. Cham and Brian R. Knowles; 1976 modificado (Cham and Knowles 1976). Esto nos permitió eliminar los triglicéridos, colesterol, fosfolípidos, y ácidos grasos no esterificados del FCS sin desnaturalizar las proteínas. Para ello se preparó una mezcla de n-butanol (SIGMA) y Di-isopropil éter (DIPE, SIGMA) 40:60 v/v y se añadieron 10 ml de esta mezcla a 5 ml de FCS en un tubo de vidrio con tapón de polietileno. Se realizó en paralelo un control de extracción con 5 ml de PBS. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la extracción, la mezcla se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos para separar la fase acuosa y la orgánica. La fase acuosa se aspiró con una jeringa y se eliminaron las trazas de disolvente sometiéndola a aspiración con una bomba de agua durante 1 minuto a 37 °C, obteniendo suero delipidado con las proteínas del FCS.

Veinte microlitros de FCS delipidado o FCS se añadieron (sin diluir y a dilución 1:2, 1:4, 1:8) a 2 ml de células marcadas con DPH a 37 °C en agitación a los 300 segundos de iniciar la lectura de la anisotropía de fluorescencia y se registró la anisotropía durante 900 segundos. El análisis de los resultados se realizó calculando la variación de la anisotropía tras la adición de FCS una vez estabilizada la señal, considerando como tal los datos recogidos de 600 a 900 segundos (Figura 12).

El efecto de una posible unión de los ácidos grasos a las proteínas del suero sobre los resultados obtenidos al determinar la fluidez de las membranas se estudió en primer lugar enriqueciendo el FCS/FCS delipidado con ácido oleico, eláidico y esteárico 100 µM. El FCS/FCS delipidado enriquecido en ácidos grasos se añadió (20 µl) a 2 ml de la suspensión de células marcadas con DPH a los 300 segundos y se registró la anisotropía durante 900 segundos, considerando para el análisis de los resultados, los datos obtenidos una vez estabilizada la señal (600-900 segundos) (Figura 12). En segundo lugar, se comprobó el efecto de la adición diferida de ácidos grasos en células previamente tratadas con FCS/FCS delipidado. Para ello, a los 300 segundos se añadió FCS ó FCS delipidado a las células marcadas y a los 800 segundos el ácido oleico, eláidico ó esteárico 10 µM registrando la anisotropía hasta 1500 segundos. El análisis de resultados se realizó con los datos obtenidos una vez estabilizada la señal (600-800 segundos y 1200-1500 segundos) (Figura 13).

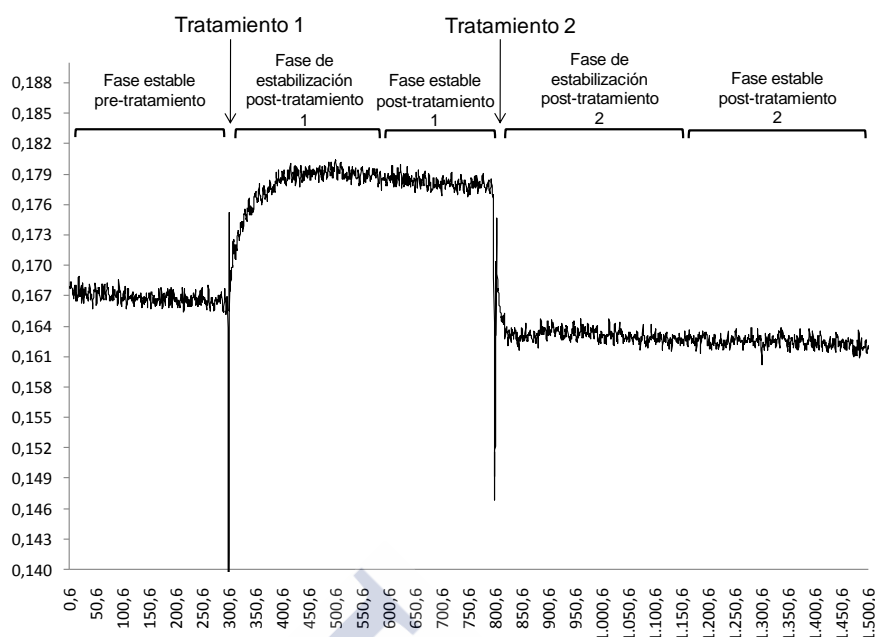


Figura 13: Anisotropía de fluorescencia en función del tiempo (segundos). Comprobada la estabilización de la señal a los 300 segundos se añade el tratamiento 1, después hay un período de estabilización que se descarta en el análisis de los resultados y éste se realiza con los datos obtenidos en la fase estable post-tratamiento-1. A los 800 segundos se añade el tratamiento 2 y se analizan los datos recogidos en la fase estable post-tratamiento-2.

Las variaciones de anisotropía con los distintos tratamientos aplicados a las células, se calcularon utilizando las medias obtenidas para los períodos de señal estable durante el pre- y post-tratamiento.

3.5-Análisis estadístico

Los resultados de este trabajo se expresaron como la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes ($n=3$). La significación estadística para 2 grupos de comparación, fue determinada con la prueba de t-student para muestras pareadas, mediante el programa StatView. Para más de 2 grupos de comparación, se utilizó el programa SigmaPlot 9.0 y se realizó la prueba de análisis de la varianza de un factor (ANOVA). La normalidad e igualdad de varianzas entre experimentos independientes se analizaron utilizando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene respectivamente (Nist/Sematech 2015). El contraste post hoc y las comparaciones múltiples por parejas se realizaron utilizando la prueba de Holm-Sidak (Keppel and Wickens 2004). Una vez comprobadas la normalidad e igualdad de las varianzas de los datos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre medias cuando $p < 0,05$. ($p < 0,05$; 5% de probabilidad de obtener diferencias debidas al azar).





RESULTADOS



4-RESULTADOS

4.1- Características morfológicas de los cultivos celulares

La línea celular MS-1 es una línea derivada de endotelio de rata obtenida mediante transformación estable con SV-40. Esto la hace particularmente útil para estudios de proliferación, ya que no es necesario obtener la línea primaria a partir de tejido vascular, pudiéndose mantener en cultivo de forma permanente. Estas células presentan una morfología típicamente poligonal y crecen en pequeñas colonias expandiéndose por la superficie de cultivo formando una monocapa. Para los experimentos realizados en este trabajo, se utilizaron células sembradas a partir de cultivos celulares con un 90% de confluencia (Figura 14 A), utilizando para los pases diluciones 1:5-1:10. Esta confluencia se alcanzó a los 2-3 días respectivamente. A partir de estos cultivos, una vez determinada la densidad celular necesaria, se sembraron las células para realizar los experimentos de ciclo celular y apoptosis y de proliferación celular. Las células se dejaron crecer 24 horas en medio completo (Figura 14 B) y se serodeprivaron durante 24 horas para sincronizar la población celular (Figura 14 C) antes de añadir el tratamiento. Las células serodeprivadas cambiaron su morfología adquiriendo forma alargada (Figura 14 C, 14 D, 14 E), pero cuando se trataron con medio completo (Figura 14 F, 14 G), recuperaron su forma poligonal y crecieron con normalidad. La adición de ácido oleico no afectó a la morfología celular (Figura 14 E, 14 G).



Figura 14: Características morfológicas de las células MS-1. (A) Células antes de ser sembradas para iniciar los experimentos (90% confluencia). (B) Células tras 24 horas de cultivo, inmediatamente antes de la serodeprivación. (C) Cultivo celular tras 24 horas de serodeprivación. (D) Células incubadas 30 horas en medio de cultivo restrictivo (0,5% FCS) tras la serodeprivación. (E) Células incubadas 30 horas en medio restrictivo suplementado con ácido oleico (10 μ M). (F) Células incubadas 30 horas en medio de cultivo completo (10% FCS) tras la serodeprivación. (G) Células incubadas 30 horas en medio completo suplementado con ácido oleico (10 μ M).

4.2- Ensayos de proliferación celular

Para evaluar la proliferación celular, se realizaron experimentos piloto de proliferación a 48 h para establecer la densidad celular óptima de partida que permitiese obtener una respuesta proliferativa máxima. Para ello se utilizaron placas de 24 pocillos en las que se sembraron 5.000, 10.000 y 20.000 células/pocillo, estimuladas posteriormente con concentraciones crecientes de FCS.

Como se puede observar en la Figura 15-A, la proliferación máxima se alcanzó al sembrar 20.000 células/pocillo, obteniéndose en estas condiciones un aumento aproximadamente lineal del número de células (calculado en base al contenido total de DNA) en función de la concentración de FCS añadido al medio.

En estas condiciones experimentales, las células MS-1 proliferaron de forma débil en respuesta a estímulos mitogénicos clásicos del endotelio (Figura 15-B), como VEGF y endotelina-1 (Shichiri, Kato et al. 1997; Zachary and Glicki 2001). No mostraron sin embargo una respuesta mitogénica apreciable tras la administración de EGF. La respuesta máxima se alcanzó a dosis de 75 nM para endotelina-1, y de 50 nM para VEGF. A dosis superiores, el efecto de ambos mitógenos se redujo (respuesta en "V" invertida).

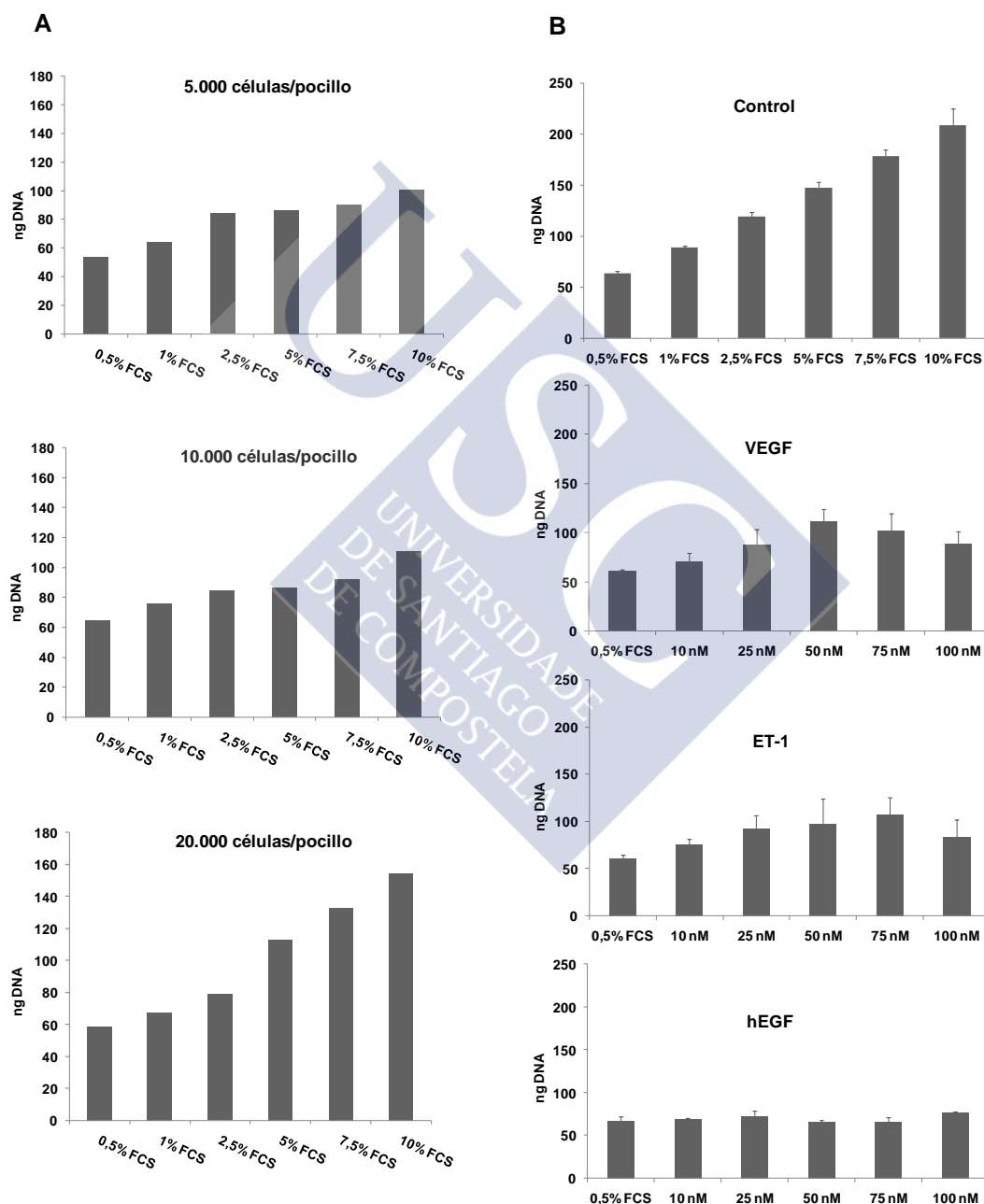


Figura 15: (A) Estandarización de las condiciones experimentales para el análisis de la proliferación celular en cultivos expuestos a concentraciones crecientes de FCS durante 48 h. Los mejores resultados se obtuvieron sembrando las células a una densidad de 20.000 células/pocillo. (B) Curva dosis-respuesta de proliferación celular de células MS-1 en respuesta a estimulación con dosis crecientes de FCS (control), VEGF, ET-1 y hEGF.

4.3-Efecto del ácido oleico sobre la proliferación celular

Para determinar el efecto del ácido oleico sobre la proliferación celular, se estudió la respuesta proliferativa de las células endoteliales a estímulos específicos de crecimiento celular, en presencia de ácido oleico. Para ello se sembraron 20.000 células/pocillo ($t = -48$ h), en placas de 24 pocillos con medio de cultivo suplementado con un 10% de FCS. A $t = -24$ h, las células se sometieron a 2 lavados consecutivos con medio libre de suero, y posteriormente se cultivaron 24 h en condiciones de serodeprivación para sincronizar la población celular (Figura 16), tras lo cual las células se lavaron con medio de cultivo libre de FCS 3 veces ($t = 0$ h), y recibieron el tratamiento correspondiente durante $t = 48$ h, transcurridas las cuales se cuantificó el contenido total de DNA mediante fluorimetría con Hoechst 33258 (Figura 17). El efecto del ácido oleico ($10 \mu\text{M}$) sobre la proliferación celular, se evaluó añadiendo a las células serodeprivadas estímulos mitogénicos específicos: VEGF (50 nM) y Endotelina-1 (75 nM). Dentro de cada serie, se incluyó una curva patrón de proliferación celular, con concentraciones crecientes de suero fetal bovino (estímulo mitogénico complejo), tanto para los experimentos realizados en condiciones control como para los realizados en presencia de ácido oleico.

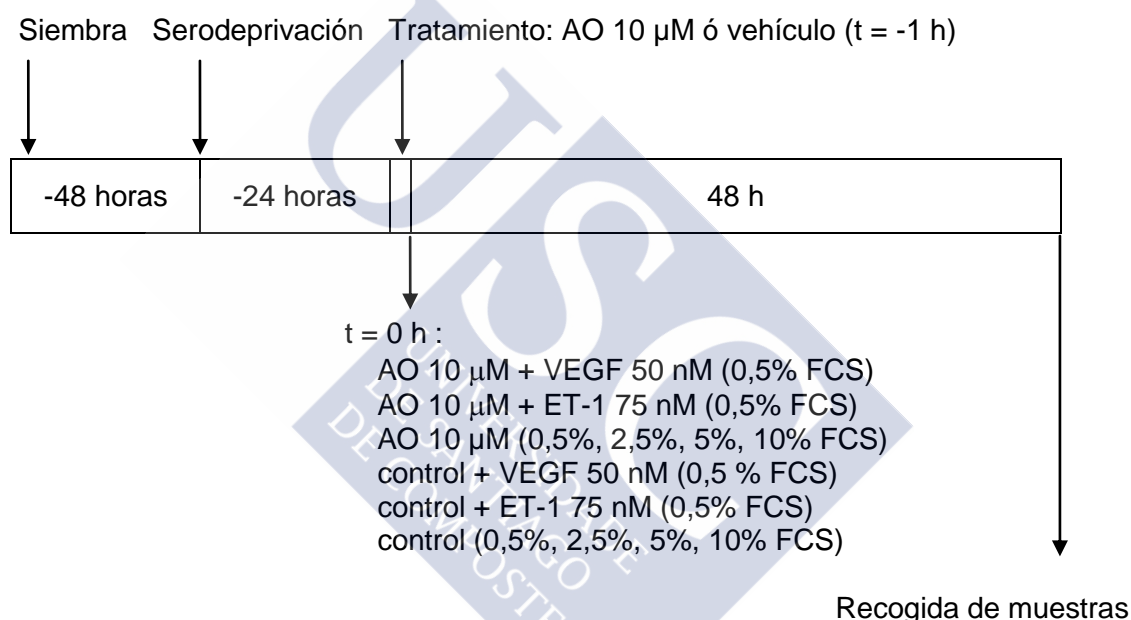


Figura 16: Diseño experimental para el experimento de proliferación celular.

Como se muestra en la Figura 17 (gráfica superior), el ácido oleico no afectó de forma estadísticamente significativa a la proliferación celular cuando las células endoteliales se trataron con concentraciones crecientes de suero fetal bovino (estímulo complejo). Sin embargo, la pre-incubación de los cultivos celulares con ácido oleico ($10 \mu\text{M}$), afectó de forma clara a la respuesta mitogénica de las células frente a estímulos específicos. En estas condiciones, el ácido oleico potenció la proliferación celular en respuesta a VEGF (50 nM) y ET-1 (75 nM). Si cuantificamos la respuesta utilizando la curva estándar de proliferación en respuesta a FCS, se comprueba que el VEGF indujo una respuesta proliferativa equivalente a la que se obtuvo con una concentración de FCS del 3,91% frente a un 0,64% en controles ($p < 0,05$). En el caso de la ET-1 la respuesta proliferativa en células tratadas con ácido oleico, sería equivalente a la obtenida en presencia de un 4,00% de FCS frente a un 1,00% en controles ($p < 0,05$).

Resulta interesante comprobar el efecto del ácido oleico sobre la proliferación celular en condiciones de hipoxia ($0,5\% \text{ O}_2$). En un contexto clínico, la hipoxia sistémica se acompaña de una marcada elevación de los ácidos grasos a nivel tisular (Hochachka 1986; Yoshida, Ikeda et

al. 1986), y se ha sugerido que esta elevación podría tener un papel protector para las células. Los resultados obtenidos en el presente estudio (Figura 17-gráfica inferior) mostraron que aunque globalmente la proliferación celular se redujo en condiciones de hipoxia, el ácido oleico potenció en mayor medida la acción mitogénica del VEGF y de la ET-1 que en condiciones de normoxia. En células serodeprivadas tratadas con ácido oleico (10 μ M) y VEGF (50 nM)/ ET-1 (75 nM), se alcanzó una proliferación celular equivalente a la obtenida con un 5,57% y un 6,80% de FCS respectivamente ($p < 0,01$).

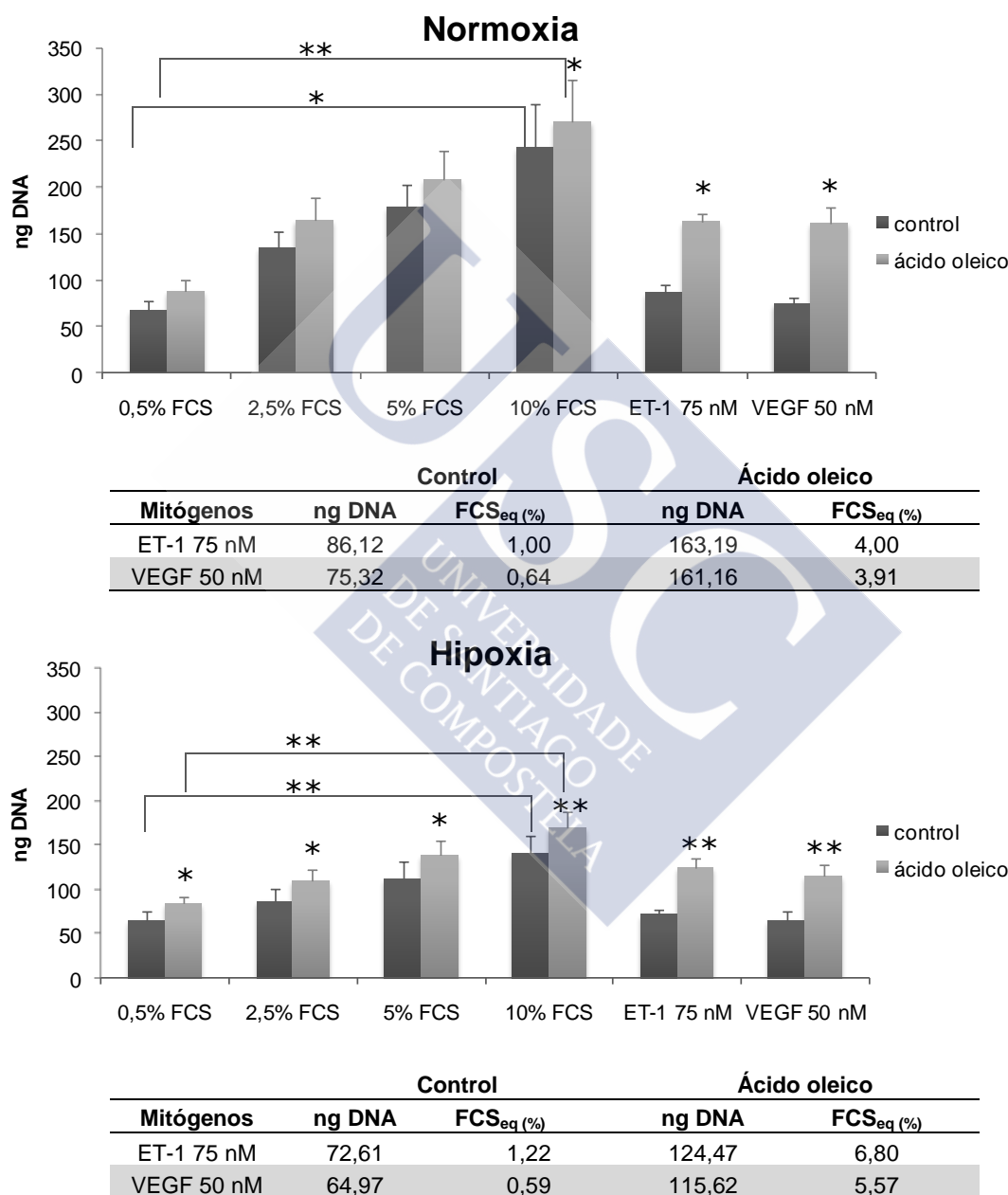


Figura 17: Proliferación celular en condiciones de normoxia e hipoxia en células control y en células tratadas con ácido oleico, en presencia de concentraciones crecientes de FCS, o dosis máximas de VEGF y endotelina-1. Los resultados muestran la media \pm EEM de 3 y 4 experimentos independientes en condiciones de normoxia e hipoxia respectivamente. La significación estadística se determinó con la prueba de t-student para muestras pareadas. (diferencias significativas respecto al control * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.4-Análisis del ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo

Para la caracterización del efecto del ácido oleico sobre la supervivencia y la proliferación endotelial, se ha utilizado un modelo experimental en el que se analiza la progresión temporal del ciclo celular mediante citometría de flujo con ioduro de propidio, en presencia o en ausencia de ácido oleico, tanto en condiciones estándar (medio completo, suplementado con FCS al 10%) como en condiciones de serodeprivación (medio restrictivo, suplementado con FCS al 0,5%).

Las células endoteliales MS-1 se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro. La siembra ($t = -48$ h) se realizó a partir de cultivos al 90% de confluencia, sembrando para cada tiempo del experimento el número de células necesario para obtener al final del mismo 1-2 millones de células/placa, concentración óptima para realizar la lectura en el citómetro de flujo. El diseño experimental se muestra en la Figura 18. A $t = -24$ h, las células se lavaron 2 veces con DMEM sin FCS, y se serodeprivaron mediante incubación en medio DMEM suplementado con un 0,5% de FCS hasta $t = -1$ h. En estas condiciones, la falta de nutrientes provocó el arresto del ciclo celular, con lo que se consiguió sincronizar el cultivo celular (el 62% de las células están en fase G0/G1 tras la serodeprivación, como muestra la Figura 19). Se lavaron a continuación las monocapas 3 veces con DMEM sin FCS, se trataron con ácido oleico (10 μ M) ó vehículo (metil- β -ciclodextrina) y se incubaron durante 1 hora a 37° C bajo una atmósfera de 95% aire/5% CO₂. Se añadió posteriormente ($t = 0$ h) FCS hasta una concentración final de 10% (medio completo) o de 0,5% (medio restrictivo) y se prosiguió la incubación, tomándose muestras a las 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 horas.

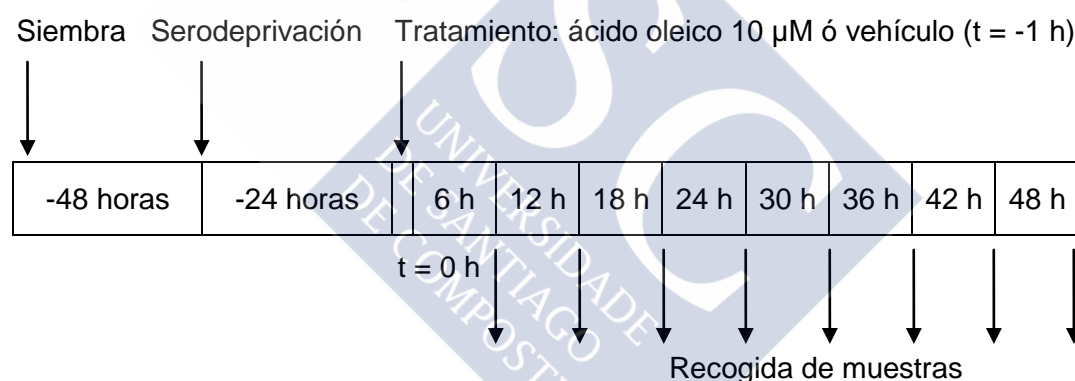


Figura 18: Diseño experimental para el análisis del ciclo celular y de la apoptosis por citometría de flujo.

El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo nos va a aportar información sobre el efecto del ácido oleico sobre la supervivencia y proliferación celular en células MS-1, ya que el análisis citométrico nos permite establecer una relación entre el contenido relativo de DNA de cada célula y la fase del ciclo celular en la que se encuentra, obteniéndose información sobre la capacidad proliferativa de una población celular. Las células con una cantidad:

- inferior a 2n de DNA, son células con el DNA fragmentado, lo cual puede correlacionarse con una fase tardía de apoptosis.
- 2n de DNA, se corresponden con las células que se encuentran en las fases G0 y G1 del ciclo celular.
- entre 2n y 4n de DNA, coinciden con las que se encuentran replicando su DNA; fase S del ciclo celular.
- 4n de DNA se corresponden con las células que están en las fases G2 y M del ciclo celular.

Hay que tener en cuenta que el análisis citométrico del contenido celular de DNA por sí solo no refleja de manera precisa la capacidad proliferativa de una población celular, por lo que estos datos deben de ser contrastados con otros métodos como la cuantificación de síntesis de DNA con Hoechst 33258 .

En el sistema celular utilizado para la realización de este trabajo, después de la sincronización celular por serodeprivación durante 24 h, se obtuvo una distribución de poblaciones constante, con mayoría de células en G0/G1, mientras que se observó una distribución minoritaria en las restantes fases del ciclo (Figura 19).

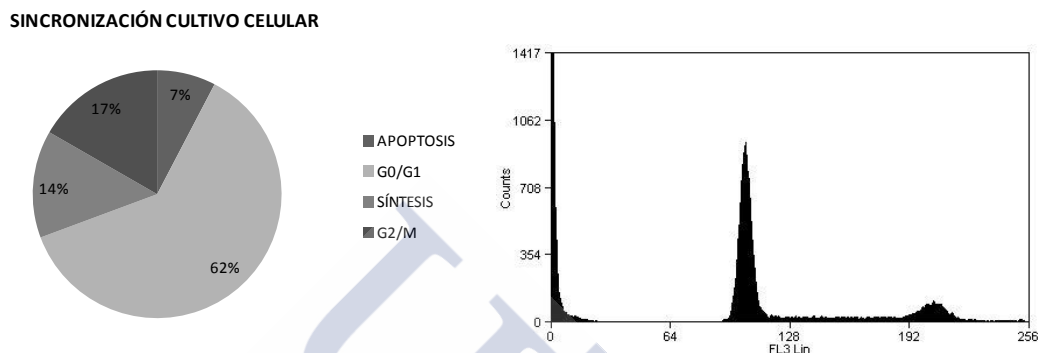


Figura 19: Determinación del grado de sincronización celular. Tras la serodeprivación de 24 h, inmediatamente antes de añadir el tratamiento ($t = 0$), un 62% de la población celular está en fase G0/G1.

En la Figura 20 se muestran los histogramas del ciclo celular de células control y tratadas con ácido oleico 10 μ M. Las Tablas 1 y 2 indican los porcentajes de células obtenidos en cada fase, en células cultivadas en presencia de medio completo y de medio restrictivo de nutrientes respectivamente.

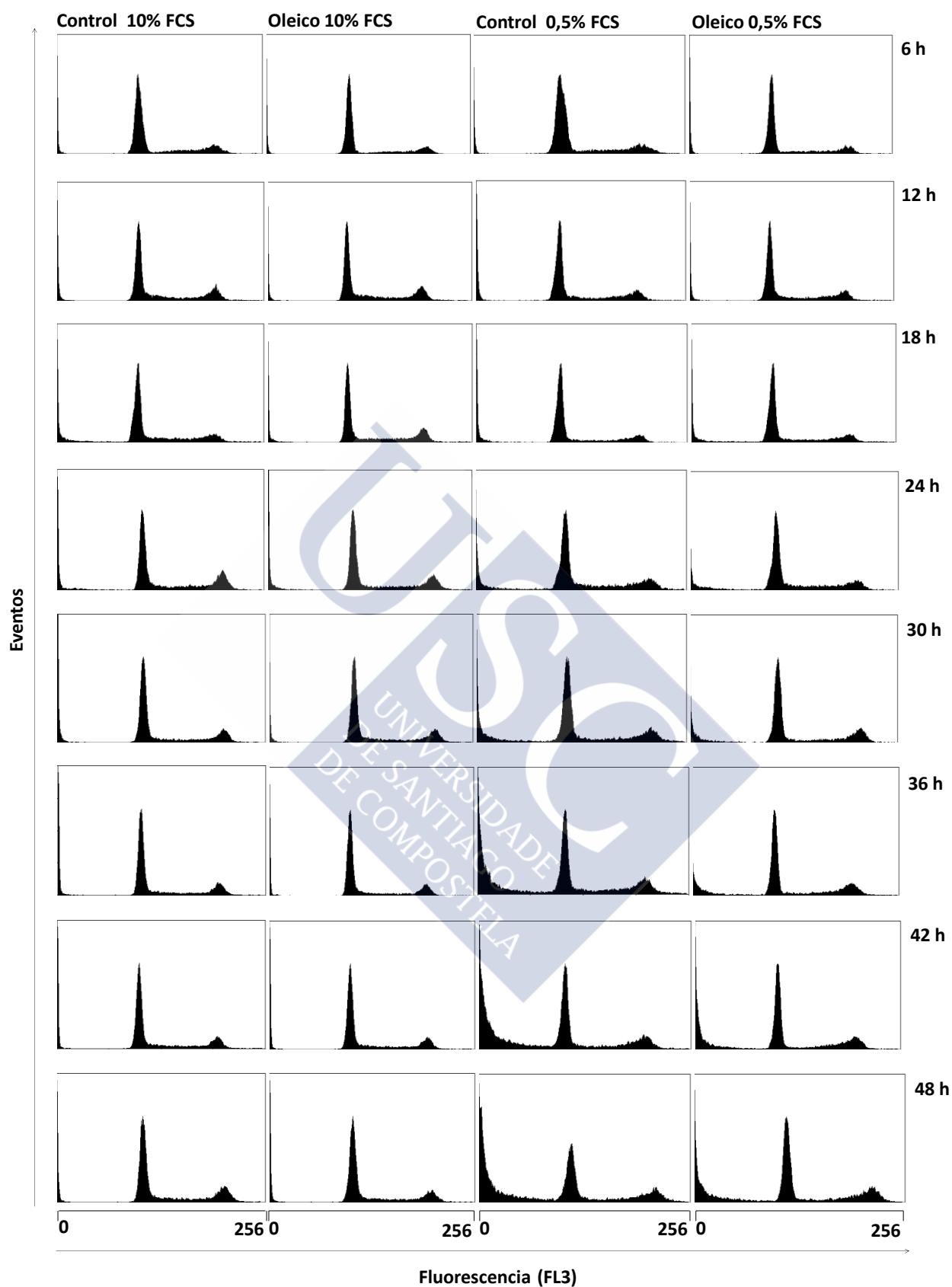


Figura 20: Histogramas del ciclo celular de células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M a las 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 h de cultivo celular.

Cuando el ciclo celular se analizó en células mantenidas en medio completo, se apreció claramente que gran parte de la población entró de forma sincronizada en el ciclo celular, en respuesta a la estimulación con FCS. El porcentaje de la población en fase S se incrementó desde $t = 6$ h, y alcanzó su pico a $t = 24$ h (Figura 21 A). A partir de ese momento, se inició un declive progresivo, de nuevo hasta los valores de pre-estimulación. El porcentaje de células en la fase G2/M también disminuye progresivamente desde $t = 24$ h (Figura 21 B). Este aumento de la población en la fase S, se vio reflejado en una reducción de la población en fase G0/G1 que siguió exactamente el mismo patrón temporal (Figura 21 C). En estas condiciones de concentración suficiente de nutrientes, la apoptosis se mantuvo en niveles reducidos a lo largo de toda la duración del experimento (Figura 21 D).

En las células tratadas con ácido oleico ($10 \mu\text{M}$) los resultados fueron similares, aunque se apreció una aceleración del ciclo celular, que se adelantó en 6 horas, alcanzándose el máximo porcentaje de población celular en las fases S y G2M a $t = 18$ h (Figura 21 E y F), y el mínimo porcentaje en fase G0/G1 también a $t = 18$ h (Figura 21 G), obteniéndose diferencias significativas con respecto a células control a $t = 24$ h en la fase S y G0/G1 ($p < 0,01$). El porcentaje de la población celular que sufrió apoptosis (Figura 21 H) fue similar al que se observó cuando las células se cultivaron en ausencia de ácido oleico (Figura 21 D), siendo muy bajo durante todo el experimento. Al analizar el área bajo la curva (AUC) de las distintas fases del ciclo celular, se vio que el tratamiento con ácido oleico provocó una disminución del AUC de la fase G2/M y un aumento del AUC de la fase G0/G1 ($p < 0,05$).

Tabla 1: Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido oleico cultivadas en presencia de medio completo.

SÍNTESIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FCS	15,74	17,28	19,57	21,16	14,58	15,61	15,00	15,13
Ácido oleico 10% FCS	14,09	18,81	19,87	17,17	16,77	14,86	16,90	17,15

G2/M

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FCS	20,19	25,63	23,04	24,19	21,36	21,07	20,70	19,96
Ácido oleico 10% FCS	17,01	20,04	22,75	21,02	17,82	19,47	19,75	18,50

G0/G1

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10 % FCS	62,80	55,63	51,62	48,45	54,23	58,57	59,33	60,11
Ácido oleico 10% FCS	66,46	57,72	52,00	56,54	56,59	60,61	59,33	59,96

APOPTOSIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FCS	1,65	2,29	6,15	6,68	9,54	4,93	5,25	4,00
Ácido oleico 10% FCS	2,45	3,67	5,81	5,86	9,34	5,24	4,37	5,11

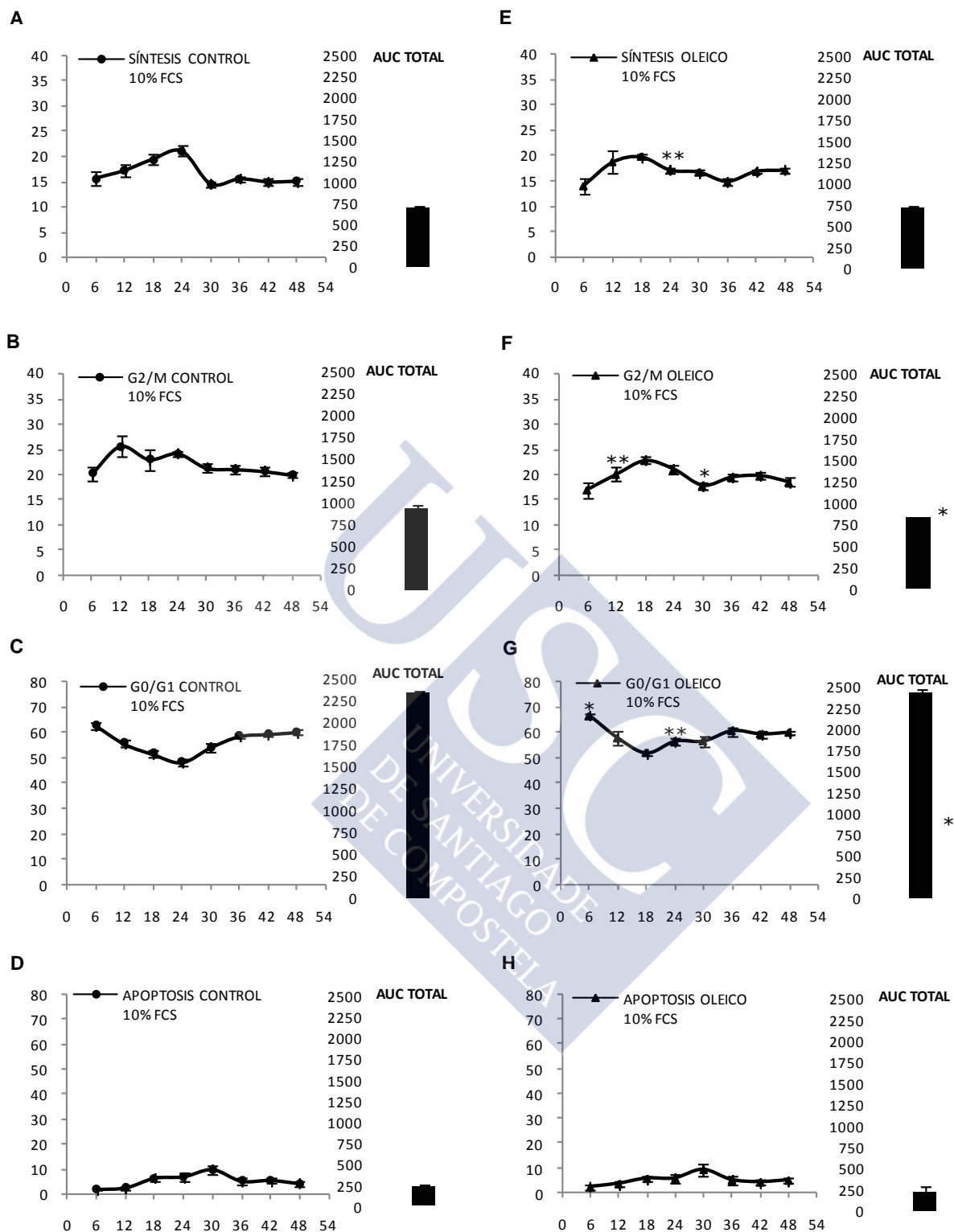


Figura 21: Fases del ciclo celular en condiciones estándar de crecimiento. Las gráficas representan el porcentaje de población celular en cada fase del ciclo celular a diferentes tiempos. Los datos muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h control vs 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h ácido oleico. En el lateral se representa la significación estadística (* $p < 0,05$, control vs. oleico) para las AUC de las diferentes fases del ciclo celular.

En condiciones de serodeprivación, las células MS-1 mostraron un discreto incremento a lo largo del tiempo del número de células que iniciaron (fase S) o han completado el ciclo celular, aunque sin mostrar un patrón sincronizado (Figura 22 A, B). Es posible que al tratarse de una línea transformada, la población posea una cierta capacidad para mantener la división celular de forma constitutiva y no sincronizada, incluso en presencia de concentraciones reducidas de mitógenos. La población en estado de quiescencia (fase G0/G1, Figura 22 C) se redujo de forma clara con el paso del tiempo. El discreto nivel de reclutamiento a fase S que se produjo en condiciones de serodeprivación no fue suficiente para explicar la progresiva reducción de la población en fase G0/G1. Sin embargo, cuando se cuantificó la población subdiploide (células con contenido de DNA inferior a 2n), se observó que en estas condiciones se produjo un aumento muy marcado de la apoptosis (Figura 22 D), hecho que sí explicaría la fuerte reducción de la población en fase G0/G1. Es probable que la tendencia de esta línea celular a mantener un cierto grado basal de reclutamiento a fase S, incluso en condiciones de serodeprivación, sea la causa de este notorio incremento de la apoptosis, ya que las células iniciarían el ciclo celular en condiciones de muy baja concentración de nutrientes.

La adición de ácido oleico (10 μ M) a células MS-1 serodeprivadas, indujo una marcada sincronización de los cultivos celulares. El porcentaje de la población en fase S aumentó progresivamente con el tiempo, alcanzándose un pico claro a $t = 24$ h (Figura 22 E) existiendo diferencias significativas con el control a $t = 18$ h ($p < 0,05$), $t = 24$ h ($p < 0,01$), $t = 30$ h ($p < 0,05$). Paralelamente al aumento de la población celular en la fase S, se produjo una disminución de la fase G0/G1 hasta $t = 24$ h (Figura 22 G), tiempo al cual se alcanzó el porcentaje mínimo de células en estado quiescente, porcentaje que se estabilizó o incluso aumentó ligeramente a partir de este punto ($p < 0,01$ a $t = 30$ h, 36 h y 42 h), a diferencia de lo que ocurría en ausencia de ácido oleico (Figura 22 C). Tal y como muestra la Figura 22 H, el ácido oleico parece ejercer un notable efecto protector sobre la supervivencia celular ($p < 0,01$ a $t = 30$ h, 36 h, 42 h y 48 h). El tratamiento con ácido oleico de células cultivadas en condiciones de restricción de nutrientes, aumentó el AUC de la fase S y de la fase G0/G1 ($p < 0,01$) y disminuyó acusadamente el AUC de apoptosis ($p < 0,01$).

Tabla 2: Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido oleico cultivadas en presencia de medio restrictivo de nutrientes.

SÍNTESIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	15,34	16,92	16,80	16,89	13,07	9,81	9,26	8,13
Ácido oleico 0,5% FCS	14,88	17,64	20,26	21,43	16,08	12,26	11,19	12,21

G2/M

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	17,43	21,88	19,02	18,21	16,20	15,68	15,29	16,02
Ácido oleico 0,5% FCS	14,76	17,66	18,42	19,32	18,18	18,16	19,72	18,55

G0/G1

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	64,75	57,58	52,35	48,13	44,55	39,48	32,89	42,17
Ácido oleico 0,5% FCS	67,82	60,30	52,55	48,70	53,65	53,01	54,24	47,62

APOPTOSIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	3,22	4,55	12,22	17,36	26,55	35,19	42,98	33,95
Ácido oleico 0,5% FCS	2,90	5,02	9,53	11,32	12,61	16,98	15,11	21,85

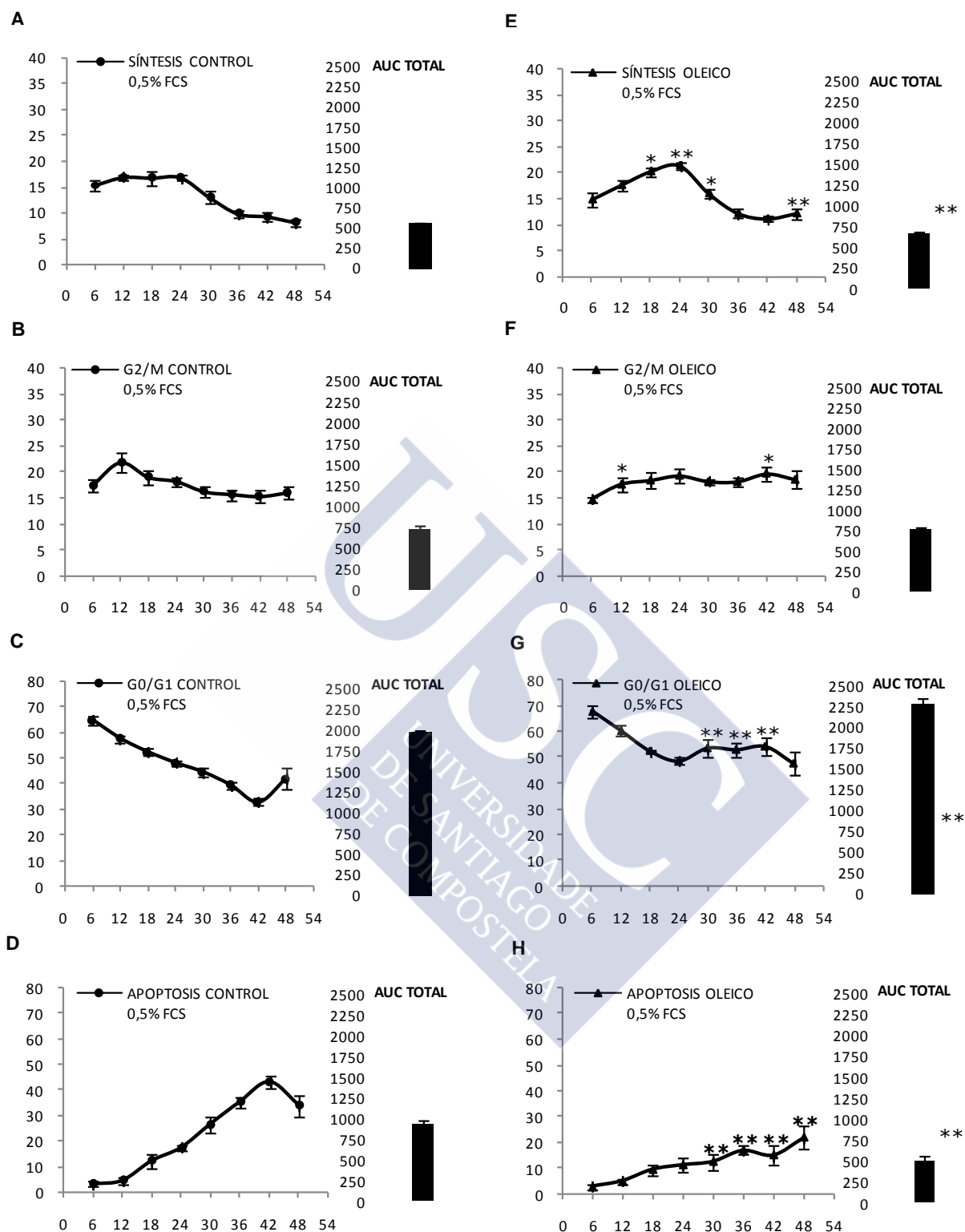


Figura 22: Fases del ciclo celular en condiciones de serodeprivación. Las gráficas representan el porcentaje de población celular en cada fase del ciclo celular a diferentes tiempos. Los datos muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h control vs 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h ácido oleico. En el lateral se representa la significación estadística (** $p < 0,01$, control vs. oleico) para las AUC de las diferentes fases del ciclo celular.

Tanto en condiciones normales como en condiciones restrictivas, la adición de ácido oleico (10 μ M), ejerció efectos interesantes. En condiciones de serodeprivación, la entrada de las células en el ciclo celular se produjo de forma sincrónica (Figura 22 E), no desorganizada como ocurrió en condiciones control (ausencia de ácido oleico) (Figura 22 A). Este efecto de sincronización fue extraordinariamente llamativo, ya que se pudo apreciar que en estas condiciones el reclutamiento de células desde fase G0/G1 a fases G2/M (Figura 22 F, G) era similar cuantitativamente y en curso temporal al que se produjo en células control en presencia de FCS al 10% (medio completo) (Figura 21 B, C), y debe tenerse en cuenta que las células se mantuvieron en todo momento en condiciones fuertemente restrictivas para el crecimiento (bajas concentraciones de mitógenos, aporte limitado de nutrientes), con la única excepción del aporte de ácido oleico, en concentraciones que no fueron suficientes para mantener la nutrición celular. El ácido oleico ejerció también un efecto llamativo sobre las células incubadas en medio completo. En estas condiciones, aunque el reclutamiento no se modificó cuantitativamente con respecto a los controles, sí lo hizo de forma cualitativa, con una aceleración de la entrada en el ciclo celular, alcanzándose el reclutamiento máximo a $t = 18$ h (Figura 21 E, F), en lugar de a $t = 24$ h (Figura 21 A, B).

Otro aspecto especialmente llamativo observado en células tratadas con ácido oleico (10 μ M) fue la disminución de la muerte celular por apoptosis, especialmente en condiciones de déficit de nutrientes (Figura 23 D). Siendo un 64,84% menor que en células no tratadas (Figura 23 C) a $t = 42$ h. Como era de esperar, en condiciones óptimas de nutrientes, el índice de apoptosis fue bajo (Figura 23 A, B), no observándose en estas condiciones diferencias entre las células control y las tratadas con ácido oleico.

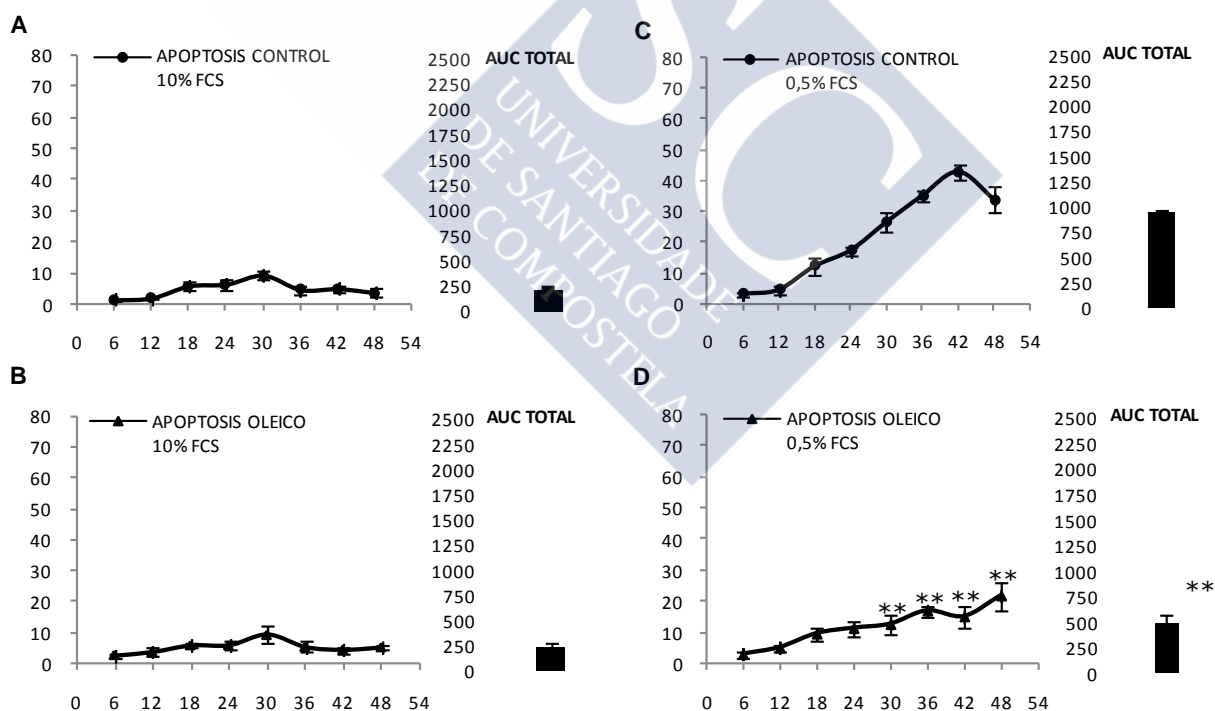


Figura 23: Efecto del ácido oleico sobre la apoptosis celular. Se representa el porcentaje de apoptosis, a los diferentes tiempos del experimento en condiciones de serodeprivación y en células cultivadas con medio completo. Los datos muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** $p < 0,01$, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h ácido oleico). En el lateral se representa la significación estadística (** $p < 0,01$, control vs. oleico) para las AUC de apoptosis.

El ácido oleico parece pues afectar de forma significativa al ciclo celular en células MS-1. Por una parte, fue capaz de mantenerlo activo y sincronizado en condiciones de restricción importante de nutrientes y factores mitogénicos. En segundo lugar, aceleró la entrada de las células en el ciclo celular en condiciones que favorecen la proliferación celular. En tercer lugar, actuó como un potente protector celular, reduciendo de forma muy notable la apoptosis en condiciones de serodeprivación.

4.5-Efecto de los ácidos saturados y *trans*-insaturados sobre el ciclo celular a las 6 y a las 48 horas

Gran parte de los efectos biológicos de los ácidos grasos libres parecen estar relacionados con su conformación espacial, con efectos claramente diferenciados para los ácidos grasos *cis*-insaturados (tipo A) y para los ácidos grasos saturados y *trans*-insaturados (tipo B) (Karnovsky 1979; Klausner, Bhalla et al. 1980; Pjura, Kleinfeld et al. 1984). Por esa razón, y para comprobar el grado de especificidad de las acciones del ácido oleico en nuestro modelo experimental, se han realizado experimentos comparando los efectos del ácido oleico sobre el ciclo celular con los obtenidos para dos ácidos grasos de tipo B: ácido esteárico (ácido graso saturado) y ácido elaídico (ácido graso *trans*-insaturado).

Para estos experimentos las células se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro a partir de cultivos al 90% de confluencia. A $t = -48$ h se sembraron $1,2 \times 10^6$ células/placa para $t = 6$ h y $5,1 \times 10^5$ células/placa para $t = 48$ h. El diseño experimental se muestra en la Figura 24. A $t = -24$ h, las células se lavaron 2 veces con DMEM sin FCS, y se serodeprivaron mediante incubación en medio DMEM suplementado con un 0,5% de FCS hasta $t = -1$ h. Se lavaron a continuación las monocapas 3 veces con DMEM sin FCS, se trataron con ácido oleico (10 μ M), ácido elaídico (10 μ M), ácido esteárico (10 μ M) ó vehículo (etanol 10 μ M) y se incubaron durante 1 hora a 37° C bajo una atmósfera de 95% aire/5% CO₂. Se añadió posteriormente ($t = 0$ h) FCS hasta una concentración final del 10% (medio completo) o del 0,5% (medio restrictivo) y se prosiguió la incubación, tomándose muestras a $t = 6$ h y $t = 48$ h.

En la Figura 25 se muestran los histogramas del ciclo celular a $t = 6$ h (A) y a $t = 48$ h (B) y en la Tabla 3 los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular para células cultivadas en presencia de medio completo (A) y de medio restrictivo (B).

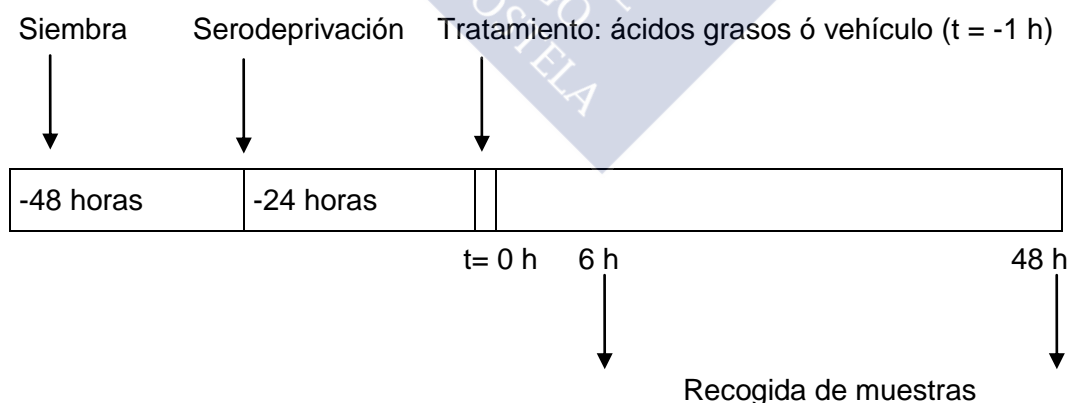


Figura 24: Diseño experimental para la determinación del efecto de los ácidos grasos tipo B sobre el ciclo celular a $t = 6$ h y $t = 48$ h.

Tal y como era de esperar, a $t = 6$ h no se observaron diferencias significativas en ninguna de las fases del ciclo celular entre las células tratadas con vehículo (etanol 10 μ M) y las tratadas con ácidos grasos, tanto si se utiliza medio restrictivo (FCS al 0,5%, Figura 26 E-H) como si se utiliza medio completo (FCS al 10%, Figura 26 A-D). Sin embargo, a las 48 horas de

añadir el tratamiento, se comprobó que los distintos ácidos grasos ejercieron efectos claramente diferentes sobre la apoptosis celular (Figura 27 D, 27 H), con una reducción significativa de la misma en células pre-incubadas con ácido oleico (ácido graso de tipo A) en comparación con lo que ocurrió en los cultivos tratados con vehículo ($p < 0,01$), esta disminución de la apoptosis es mayor que la que se obtiene con ácidos grasos de tipo B ($p < 0,01$). Cuando los experimentos se realizaron en medio completo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de ácidos grasos, aunque los niveles de apoptosis en células tratadas con ácido esteárico fueron mayores que en células tratadas con vehículo, ácido oleico y ácido elaídico (Figura 27 D). Se detectaron también diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p < 0,01$) en la proporción de células en fase G0/G1 a $t = 48$ h en experimentos realizados en medio restrictivo, proporción que fue mayor en las células tratadas con ácido oleico (Figura 27 G). El ácido oleico por lo tanto parece ejercer un efecto protector sobre la supervivencia celular en condiciones de restricción de nutrientes, mayor que el efecto que se detectó cuando las células se pre-incubaban en presencia de ácidos grasos de tipo B, tanto saturados como *trans*-insaturados.

Tabla 3 : Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M, ácido elaídico 10 μ M, ácido esteárico 10 μ M cultivadas en presencia de medio completo (A) y de medio restrictivo (B).

A

SÍNTESIS

Tratamiento	6 h	48 h
Control 10%FCS	13,44	13,207
Ácido oleico 10% FCS	13,257	13,19
Ácido elaídico 10% FCS	14,54	12,67
Ácido esteárico 10% FCS	13,443	11,497

G2/M

Tratamiento	6 h	48 h
Control 10%FCS	19,423	20,497
Ácido oleico 10% FCS	19,87	20,967
Ácido elaídico 10% FCS	21,1	19,277
Ácido esteárico 10% FCS	19,54	17,347

G0/G1

Tratamiento	6 h	48 h
Control 10%FCS	65,84	58,593
Ácido oleico 10% FCS	64,757	57,943
Ácido elaídico 10% FCS	63,573	59,017
Ácido esteárico 10% FCS	65,213	58,343

APOPTOSIS

Tratamiento	6 h	48 h
Control 10% FCS	1,607	6,58
Ácido oleico 10% FCS	2,077	7,43
Ácido elaídico 10% FCS	1,22	7,5
Ácido esteárico 10% FCS	2,127	12,43

B

SÍNTESIS

Tratamiento	6 h	48 h
Control 0,5%FCS	14,877	10,563
Ácido oleico 0,5% FCS	14,247	9,997
Ácido elaídico 0,5% FCS	14,9	10,76
Ácido esteárico 0,5% FCS	13,807	9,807

G2/M

Tratamiento	6 h	48 h
Control 0,5%FCS	18,94	19,667
Ácido oleico 0,5% FCS	18,68	21,57
Ácido elaídico 0,5% FCS	18,55	22,803
Ácido esteárico 0,5% FCS	19,067	21,79

G0/G1

Tratamiento	6 h	48 h
Control 0,5%FCS	64,63	35,1
Ácido oleico 0,5% FCS	64,96	58,023
Ácido elaídico 0,5% FCS	64,893	47,767
Ácido esteárico 0,5% FCS	64,69	39,51

APOPTOSIS

Tratamiento	6 h	48 h
Control 0,5% FCS	2,093	35,7
Ácido oleico 0,5% FCS	2,027	11,09
Ácido elaídico 0,5% FCS	1,487	19,497
Ácido esteárico 0,5% FCS	2,473	29,653

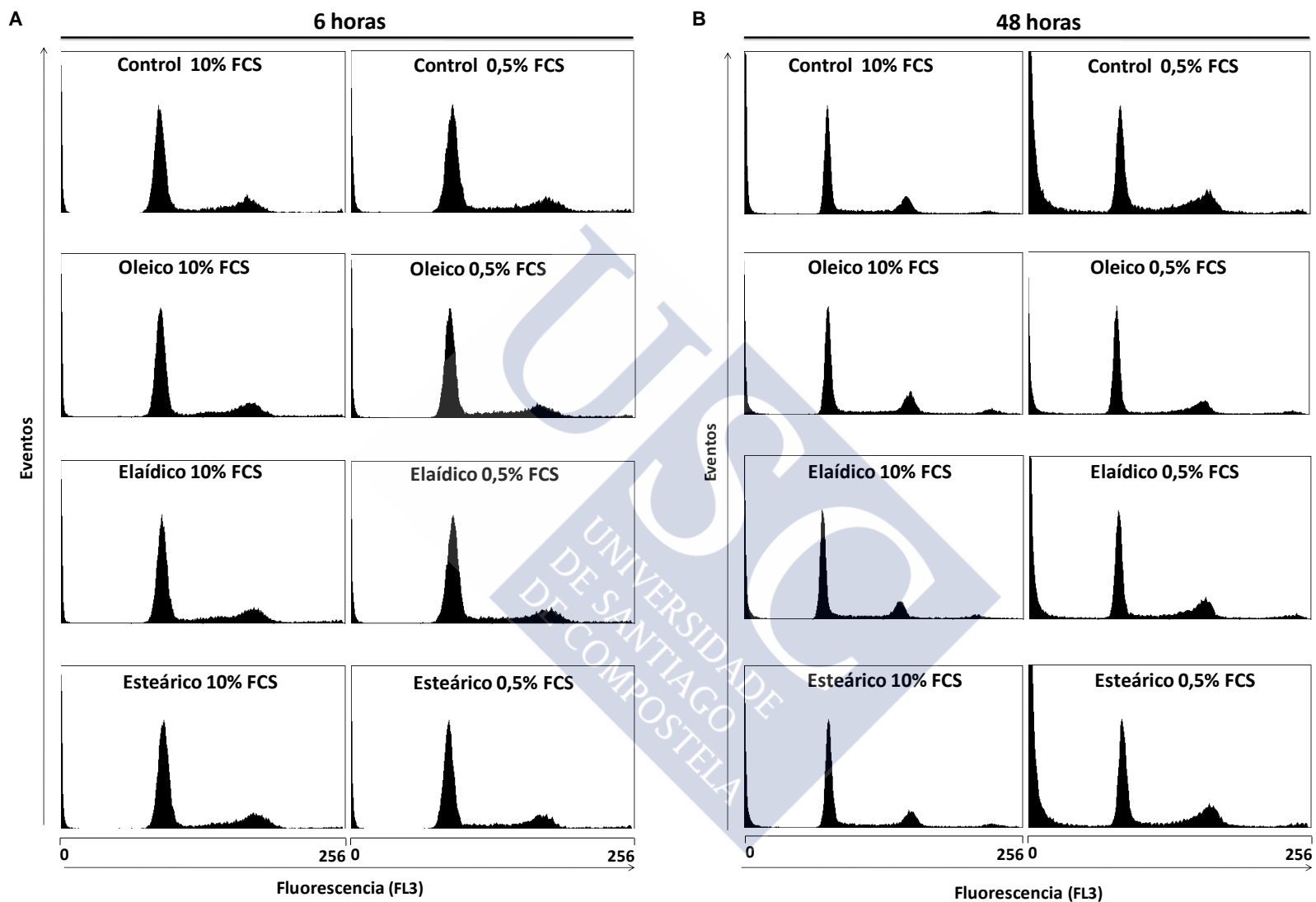


Figura 25: Histogramas del ciclo celular a las 6 h y 48 h: A) 6 h de cultivo, B) 48 h de cultivo celular.

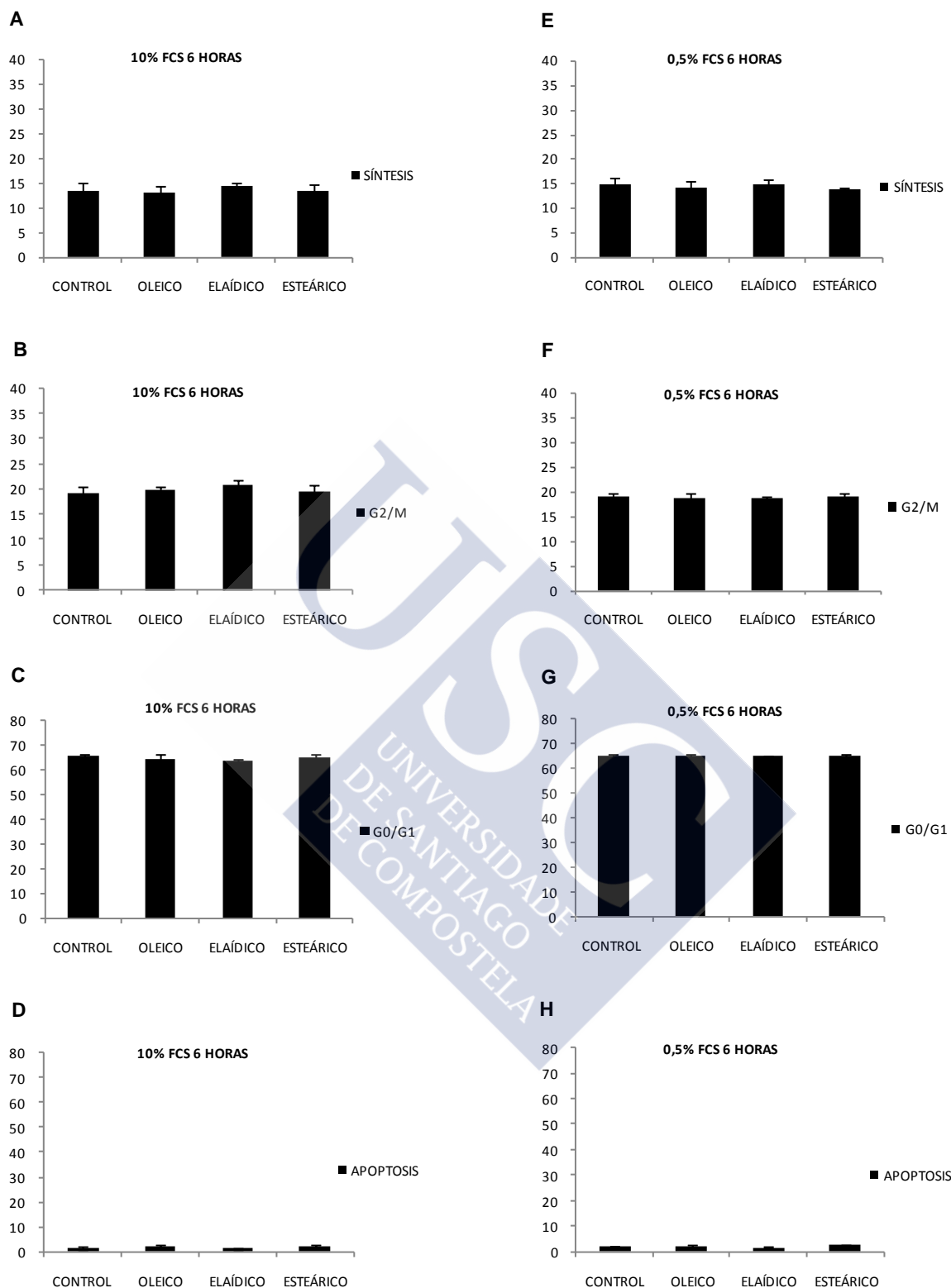


Figura 26: Efecto de los ácidos grasos tipo A y B sobre el ciclo celular a $t = 6$ horas de la adición del tratamiento. En las gráficas se representa el % de células en cada fase del ciclo celular en función del tipo de ácido graso. Los datos muestran la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA).

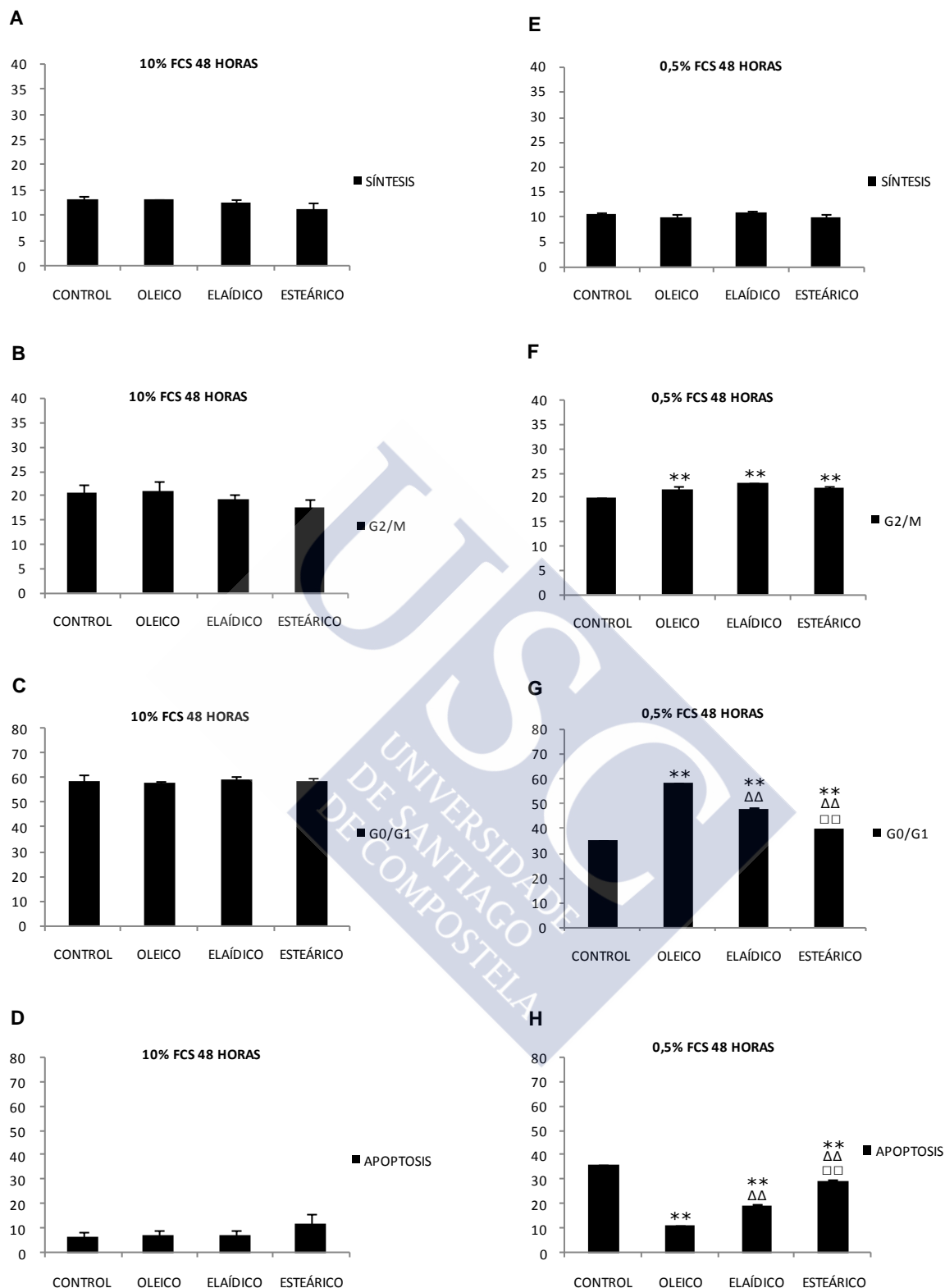


Figura 27: Efecto de los ácidos grasos tipo A y B sobre el ciclo celular a t = 48 horas de la adición del tratamiento. Las gráficas representan el % de células en cada fase del ciclo celular en función del tipo de ácido graso. Los datos muestran la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** p<0,01, control vs ácido oleico, ácido elaídico, ácido esteárico; $\Delta\Delta$ p<0,01, ácido oleico vs ácido elaídico, ácido esteárico; $\square\square$ p<0,01, ácido elaídico vs ácido esteárico).

4.6-Efecto de los ácidos elaídico y esteárico sobre el ciclo celular

Debido a las diferencias observadas a las 48 h de tratamiento entre los ácidos grasos tipo A y tipo B, se decidió estudiar el efecto de los ácidos grasos tipo B sobre la progresión del ciclo celular en células MS-1.

Para estos experimentos las células se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro a partir de cultivos al 90% de confluencia, sembrando para cada tiempo del experimento el número de células necesario para obtener al final del mismo 1-2 millones de células/placa, concentración óptima para realizar la lectura en el citómetro de flujo. El diseño experimental se muestra en la Figura 28. A $t = -24$ h, las células se lavaron 2 veces con DMEM sin FCS, y se serodeprivaron mediante incubación en medio DMEM suplementado con un 0,5% de FCS hasta $t = -1$ h. Se lavaron a continuación las monocapas 3 veces con DMEM sin FCS, se trataron con ácido elaídico (10 μ M), ácido esteárico (10 μ M) ó vehículo (etanol 10 μ M) y se incubaron durante 1 hora a 37° C bajo una atmósfera de 95% aire/5% CO₂. Se añadió posteriormente ($t = 0$ h) FCS hasta una concentración final del 10% (medio completo) o del 0,5% (medio restrictivo) y se prosiguió la incubación, tomándose muestras a $t = 6$ h, $t = 12$ h, $t = 18$ h, $t = 24$ h, $t = 30$ h, $t = 36$ h, $t = 42$ h y $t = 48$ h.

Las Figuras 29 y 30 muestran los histogramas del ciclo celular de células control y tratadas con ácido elaídico 10 μ M y con ácido esteárico 10 μ M respectivamente. En la Tabla 4 se indican los porcentajes de células obtenidos para cada fase, en células cultivadas en presencia de medio completo y en Tabla 5 en células cultivadas en presencia de medio restrictivo de nutrientes.

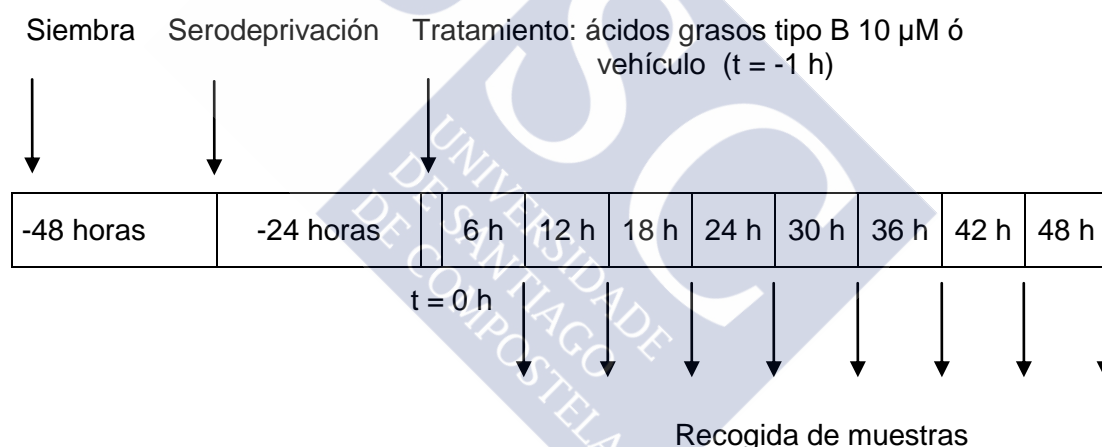


Figura 28: Diseño experimental para la determinación del efecto de los ácidos grasos tipo B sobre la progresión del ciclo celular.

La adición de suero al medio de cultivo (Figura 31 A) provocó un aumento progresivo del número de células que entraron en la fase S, alcanzándose el máximo porcentaje a las 24 h (21,16%). Al mismo tiempo que aumentó la población celular en la fase S, disminuyó el porcentaje de células en G0/G1 hasta las 24h. A partir de las 24 h, la síntesis cae y aumenta la fase G0/G1 hasta los valores iniciales. En la fase G2/M se observó un pequeño aumento inicial hasta las 12 h y a partir de las 24 h disminuyó paulatinamente. La apoptosis celular se mantuvo en niveles bajos durante todo el experimento.

El tratamiento con ácido elaídico 10 μ M (Figura 31 B) hizo que se obtuviera un pico de síntesis a las 24 h (24,63%) mayor que en células control (21,16%) obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El porcentaje de células en estado quiescente decreció hasta las 24 h y a partir de las 24 h volvió a aumentar hasta las 48 h. La población celular en la fase S disminuye bruscamente a las 30 h (14,79%), y se mantiene en torno a esos

valores hasta las 48 h. El número de células en la fase G2/M sufrió una disminución progresiva en el tiempo, pero a las 6, 12, y 18 h se observó un mayor porcentaje en células tratadas con ácido elaídico, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p<0,01$). El área bajo la curva de la fase G2/M en células tratadas con ácido elaídico fue mayor con respecto al control ($p<0,01$).

El tratamiento con ácido esteárico 10 μ M (Figura 31 C) no modificó la curva de la fase S con respecto al control; la población en fase S aumenta hasta las 24 h (22,35%) y a las 30 h cae (13,98%) manteniéndose más o menos en esos valores hasta las 48h. El porcentaje de células en estado quiescente disminuyó hasta las 18-24 h y a partir de este tiempo volvió a aumentar hasta las 48 h. El número de células en la fase G2/M aumenta desde las 6 a las 12 h de cultivo, después disminuyó progresivamente en el tiempo, sin embargo se observó un pequeño pico a las 30 h ($p<0,05$), pero a las 6, 12, y 18 h se observó un mayor porcentaje en las células tratadas con ácido esteárico obteniéndose diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p<0,01$). El área bajo la curva de la fase G2/M en células tratadas con ácido esteárico fue mayor con respecto al control ($p<0,01$). Los niveles de apoptosis en estas condiciones de cultivo fueron bajos durante todo el experimento, aunque se obtuvieron a las 24 y 30 h niveles más bajos que en células control ($p<0,05$ y $p<0,01$ respectivamente).



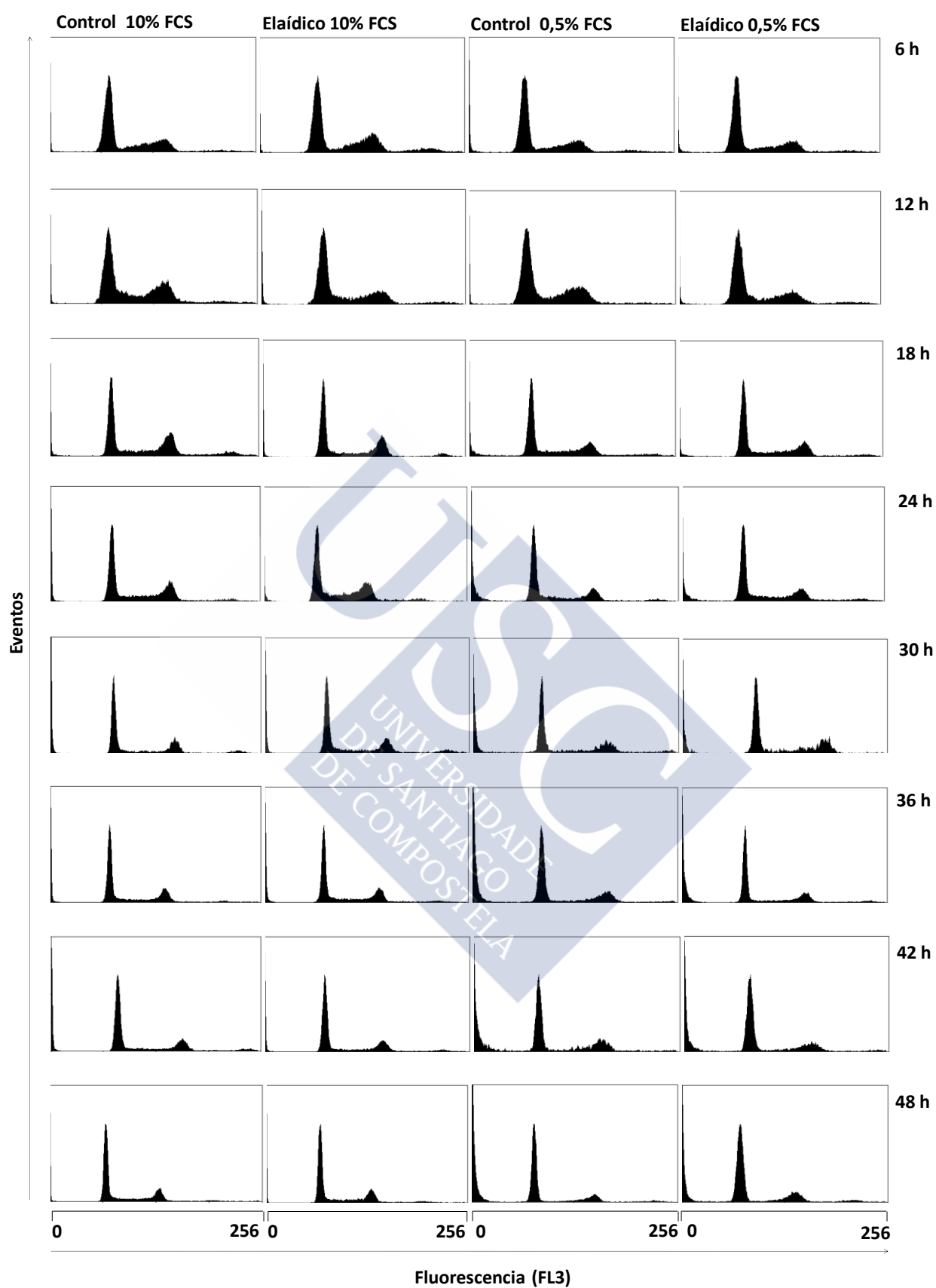


Figura 29: Histogramas del ciclo celular de células control y células tratadas con ácido eláidico 10 μ M a las 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 h de cultivo celular.

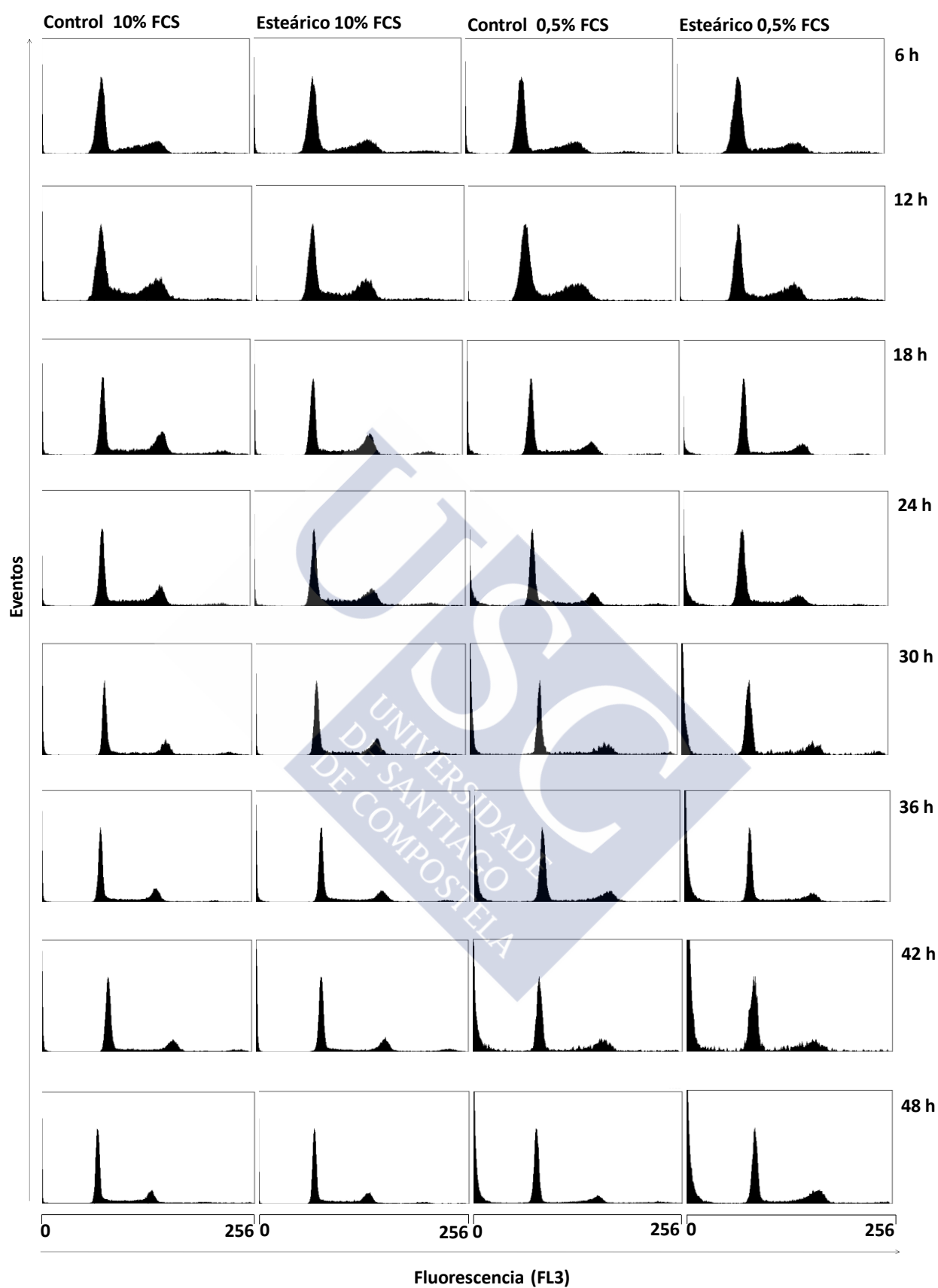


Figura 30: Histogramas del ciclo celular de células control y células tratadas con ácido esteárico 10 μ M a las 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 h de cultivo celular.

Tabla 4: Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido eláídico 10 μ M, ácido esteárico 10 μ M cultivadas en presencia de medio completo.

SÍNTESIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FCS	15,74	17,28	19,57	21,16	14,58	15,61	15,00	15,13
Ácido eláídico 10% FCS	13,80	16,46	17,89	24,63	14,79	16,60	12,92	13,93
Ácido esteárico 10% FCS	14,79	16,85	19,33	22,35	13,98	14,89	12,35	14,42

G2/M

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FCS	20,19	25,63	23,04	24,19	21,36	21,07	20,70	19,96
Ácido eláídico 10% FCS	28,67	29,77	27,72	26,77	23,07	23,73	23,27	20,55
Ácido esteárico 10% FCS	25,48	31,14	27,71	24,29	25,64	22,68	20,36	20,87

G0/G1

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FBS	62,80	55,63	51,62	48,45	54,23	58,57	59,33	60,11
Ácido eláídico 10% FCS	57,46	53,85	52,35	47,30	54,58	53,13	61,06	61,58
Ácido esteárico 10% FCS	59,49	52,47	49,13	50,31	54,31	56,70	60,90	60,65

APOPTOSIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FCS	1,65	2,29	6,15	6,68	9,54	4,93	5,25	4,00
Ácido eláídico 10% FCS	0,88	0,62	3,10	3,18	6,51	6,56	2,62	1,22
Ácido esteárico 10% FCS	0,93	0,74	4,24	3,14	4,34	5,59	6,34	1,22

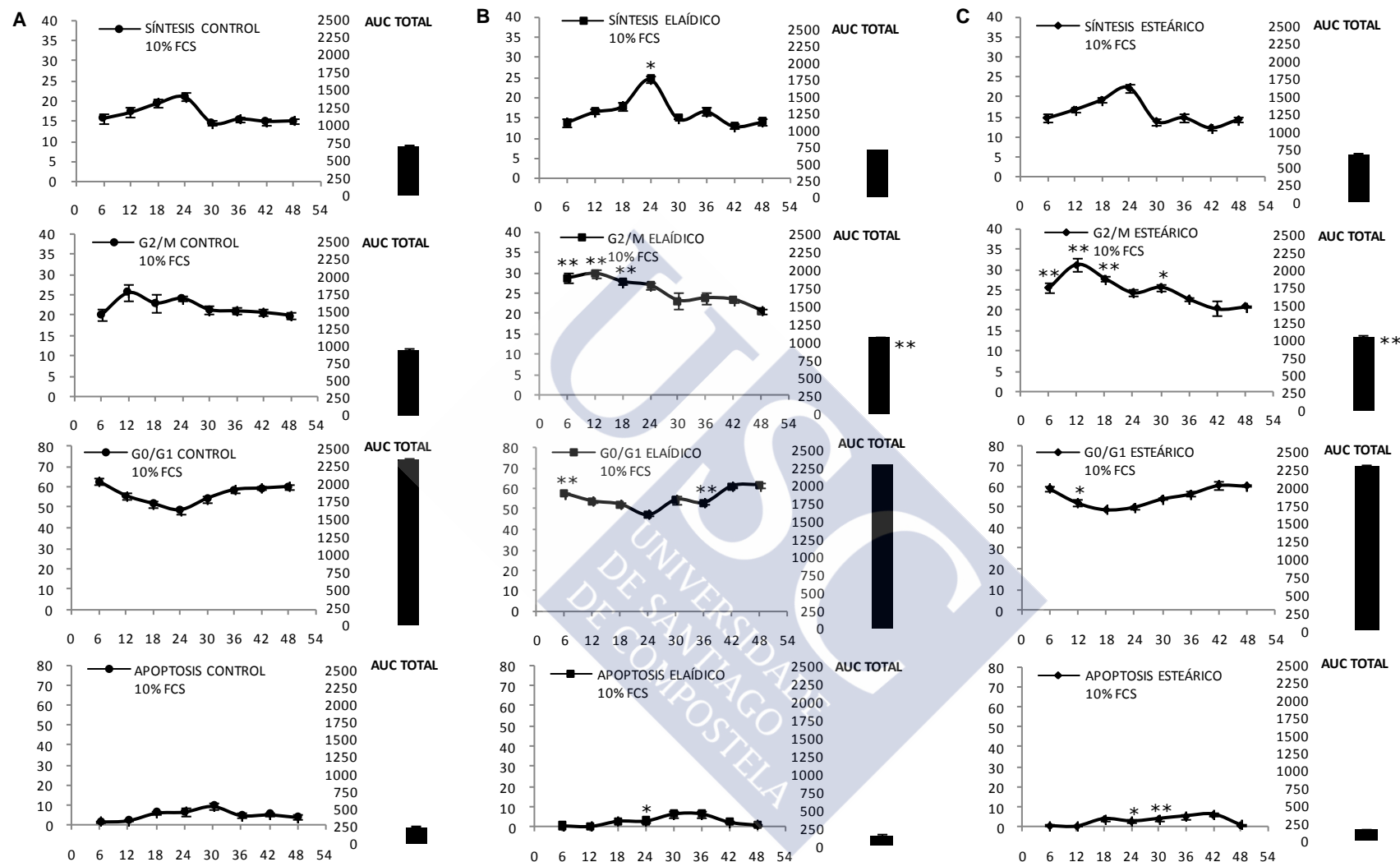


Figura 31: Fases del ciclo celular en condiciones estándar de crecimiento. Las gráficas representan el porcentaje de población celular en cada fase del ciclo celular a diferentes tiempos. Los datos muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h control vs 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h ácido eláidico. En el lateral se representa la significación estadística (** $p < 0,01$, control vs (B) eláidico (C) esteárico) para las AUC de las diferentes fases del ciclo celular.

En condiciones de serodeprivación (Figura 32 A), el número de células en fase S se mantiene estable desde $t = 6$ h, hasta $t = 24$ h, posteriormente disminuye con el tiempo de cultivo. La población en estado de quiescencia (fase G0/G1) se redujo de forma clara con el paso del tiempo. El discreto nivel de reclutamiento a fase S que se produjo en condiciones de serodeprivación no fue suficiente para explicar la progresiva reducción de la población en fase G0/G1. Sin embargo, cuando se cuantificó la población subdiploide (células con contenido de DNA inferior a $2n$), se observó que en estas condiciones se produjo un aumento muy marcado de la apoptosis, hecho que sí explicaría la fuerte reducción de la población en fase G0/G1.

La adición de ácido eláidico $10 \mu\text{M}$ (Figura 32 B), produjo un aumento de la población que entra en la fase S en condiciones de restricción de nutrientes hasta las 18 h de cultivo, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) con respecto al control a las 18 h. La población en estado quiescente disminuye progresivamente desde las 6 h hasta las 36 h de cultivo (al igual que la fase G2/M), siendo éste el tiempo al cual se obtuvo un mayor porcentaje de células apoptóticas. Desde las 36 h aumenta la población en la fase G0/G1 ($p < 0,01$) y la apoptosis celular empieza a caer obteniéndose diferencias estadísticamente significativas con respecto al control a las 42 y 48 h de cultivo ($p < 0,01$). El área bajo la curva de la población en estado de quiescencia resultó ser significativamente mayor que en el control ($p < 0,01$), y para la apoptosis celular menor ($p < 0,01$).

La adición de ácido esteárico $10 \mu\text{M}$ (Figura 32 C), produjo un aumento de la población que entra en la fase S en condiciones de restricción de nutrientes desde las 6 h (15,69%) hasta las 18 h de cultivo (18,85%), a partir de las 18 h cayó paulatinamente hasta las 48 h de tratamiento (6,20%), observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al control a las 24, 30 y 36 h. Esta menor tasa de síntesis celular se vio reflejada en una menor área bajo la curva en células cultivadas en presencia de ácido esteárico con respecto al control ($p < 0,01\%$). La población en fase G2/M aumentó desde las 6 a las 12 h obteniéndose diferencias con el control estadísticamente significativas ($p < 0,05$), después disminuyó drásticamente hasta las 42 h siendo significativas las diferencias a las 36 y 42 h ($p < 0,01$) con respecto al control. El número de células en estado quiescente disminuye progresivamente desde las 6 h hasta las 36 h de cultivo; a este tiempo se obtuvo la mayor tasa de apoptosis celular. Desde las 36 h aumenta la población en la fase G0/G1 hasta las 48 h, pero los valores fueron menores que en el control ($p < 0,05$). El área bajo la curva de la fase G0/G1 fue menor que la que se obtuvo en células no tratadas con ácido esteárico ($p < 0,01$). La apoptosis celular aumentó bruscamente desde las 12 h hasta las 36 h de cultivo, posteriormente empezó a caer obteniéndose diferencias estadísticamente significativas con respecto al control a las 30, 36, 42 y 48 h de cultivo. El área bajo la curva de apoptosis fue significativamente mayor que en el control ($p < 0,01$).

Tabla 5: Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido eláídico 10 μ M, ácido esteárico 10 μ M cultivadas en presencia de medio restrictivo de nutrientes.

SÍNTESIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	15,34	16,92	16,80	16,89	13,07	9,81	9,26	8,13
Ácido eláídico 0,5% FCS	14,91	16,43	20,62	17,44	13,19	9,67	7,83	6,19
Ácido esteárico 0,5% FCS	15,69	16,79	18,85	12,26	9,17	6,86	6,56	6,20

G2/M

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	17,43	21,88	19,02	18,21	16,20	15,68	15,29	16,02
Ácido eláídico 0,5% FCS	19,61	23,03	22,87	18,86	20,05	14,43	15,85	17,45
Ácido esteárico 0,5% FCS	20,25	26,22	20,16	15,98	14,11	10,74	8,75	13,28

G0/G1

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	64,75	57,58	52,35	48,13	44,55	39,48	32,89	42,17
Ácido eláídico 0,5% FCS	63,18	59,49	51,55	49,46	48,61	47,52	50,54	57,77
Ácido esteárico 0,5% FCS	63,31	57,41	51,87	49,67	39,93	30,79	33,76	35,45

APOPTOSIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	3,22	4,55	12,22	17,36	26,55	35,19	42,98	33,95
Ácido eláídico 0,5% FCS	2,68	1,63	6,07	14,21	18,34	28,91	26,06	18,46
Ácido esteárico 0,5% FCS	1,71	0,72	10,29	22,14	36,76	50,98	51,42	45,09

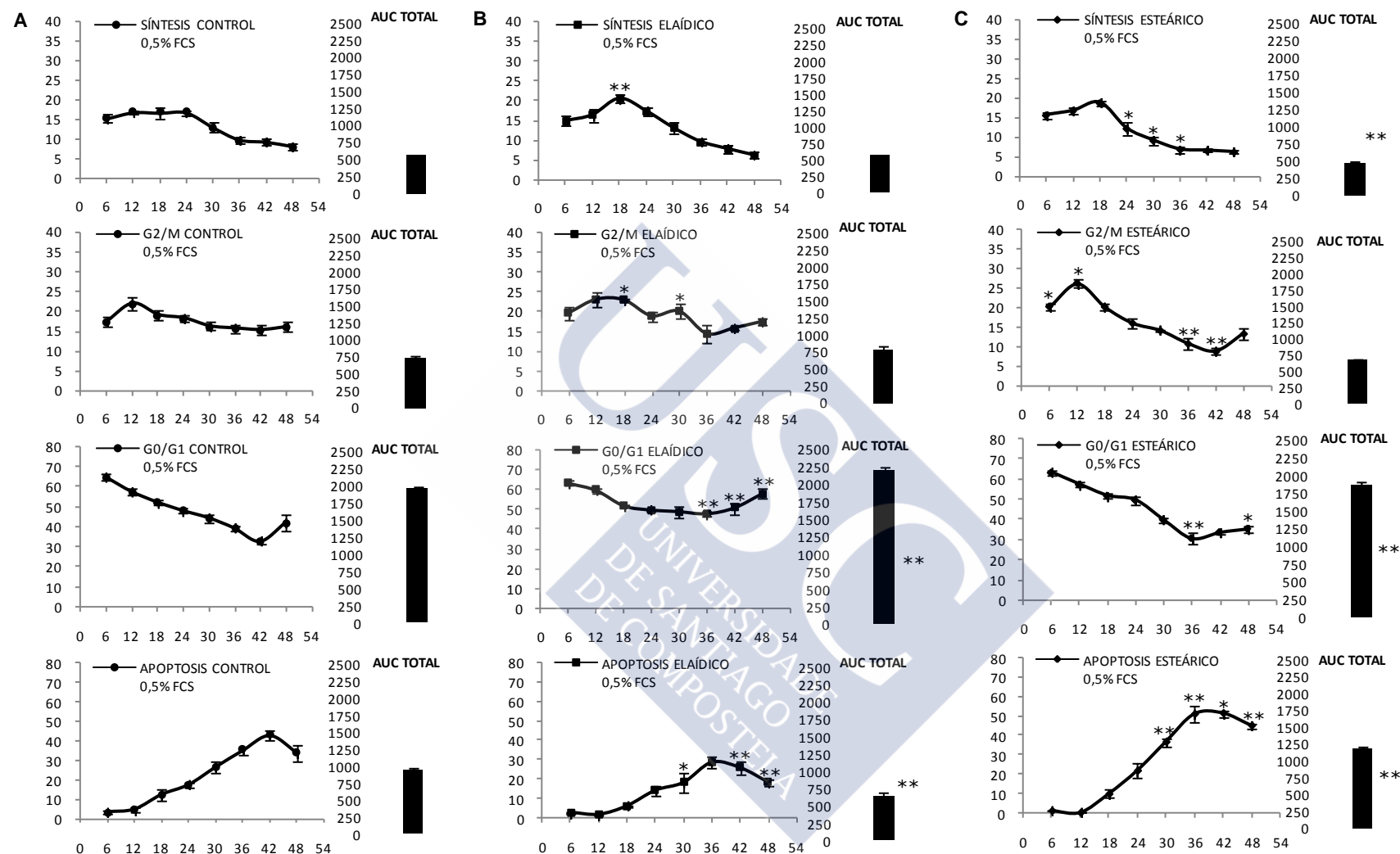


Figura 32: Fases del ciclo celular en condiciones de serodeprivación. Las gráficas representan el porcentaje de población celular en cada fase del ciclo celular a diferentes tiempos. Los datos muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes a las 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h del control vs 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h de ácido elaidico o esteárico. En el lateral se representa la significación estadística para las AUC de las diferentes fases del ciclo celular. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). ** diferencias significativas respecto al control $p < 0,01$. * diferencias significativas respecto al control $p < 0,05$.

4.7-Diferencias entre el ácido oleico, eláidico y esteárico en el ciclo celular

Síntesis

En condiciones óptimas de nutrientes (Tabla 6, Figura 33 A), se observó un aumento del porcentaje de células en fase S desde las 6 hasta las 24 h, tanto en células control como en células tratadas con ácido eláidico y esteárico 10 μ M, después cayó hasta los valores iniciales y se mantuvo prácticamente constante hasta las 48 h de cultivo. Sin embargo en células tratadas con ácido oleico 10 μ M se apreció una aceleración del ciclo celular, que se adelantó en 6 horas, alcanzándose el máximo porcentaje de población celular en la fase S a las 18 h de cultivo, y a las 24 h disminuyó ligeramente y se mantuvo en esos valores hasta las 48 h.

Tabla 6: Porcentajes de células en la fase S del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M, ácido eláidico 10 μ M y ácido esteárico 10 μ M cultivadas en presencia de medio completo.

SÍNTESIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FCS	15,74	17,28	19,57	21,16	14,58	15,61	15,00	15,13
Ácido oleico 10% FCS	14,09	18,81	19,87	17,17**	16,77	14,86	16,90	17,15
Ácido eláidico 10% FCS	13,80	16,46	17,89	24,63 ^{*ΔΔ}	14,79	16,60	12,92 ^Δ	13,93 ^Δ
Ácido esteárico 10% FCS	14,79	16,85	19,33	22,35 ^{ΔΔ}	13,98	14,89	12,35 ^{ΔΔ}	14,42

* Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$, $n = 4$).

** Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$, $n = 4$).

Δ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

ΔΔ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

En células serodeprivadas (Tabla 7, Figura 33 E) el ácido oleico indujo una entrada en la fase S similar a la obtenida en células control cultivadas en medio completo, obteniéndose el pico de síntesis a las 24 h de cultivo. Sin embargo en células control la tasa de síntesis se mantuvo constante desde las 6 hasta las 24 h de tratamiento. En células tratadas con ácido eláidico 10 μ M ó ácido esteárico 10 μ M la tasa de síntesis aumentó hasta las 18 h y posteriormente cayó con el tiempo de cultivo. Estas diferencias se vieron reflejadas en el área bajo la curva de síntesis (Figura 34 B); el AUC en células tratadas con ácido oleico 10 μ M es significativamente mayor que en células control y que en células tratadas con ácido eláidico y esteárico ($p < 0,01$).

Tabla 7: Porcentajes de células en la fase S del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M, ácido eláidico 10 μ M y ácido esteárico 10 μ M cultivadas en presencia de medio restrictivo de nutrientes.

SÍNTESIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	15,34	16,92	16,80	16,89	13,07	9,81	9,26	8,13
Ácido oleico 0,5% FCS	14,88	17,64	20,26*	21,43**	16,08*	12,26	11,19	12,21**
Ácido eláidico 0,5% FCS	14,91	16,43	20,62**	17,44 ^Δ	13,19	9,67	7,83 ^Δ	6,19 ^{ΔΔ}
Ácido esteárico 0,5% FCS	15,69	16,79	18,85	12,26 ^{*ΔΔ□}	9,17 ^{*ΔΔ□}	6,86*	6,56	6,20 ^{ΔΔ}

* Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$, $n = 4$).

** Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$, $n = 4$).

Δ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

ΔΔ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

□ Diferencias significativas del ácido eláidico vs ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

G2/M

En células cultivadas en medio de cultivo completo (Tabla 8, Figura 33 B), el tratamiento con ácido oleico 10 μ M indujo una disminución de la tasa de células en G2/M con respecto al control durante todo el experimento, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas a las 12 h ($p < 0,01$) y a las 30 h ($p < 0,05$). Ésto se vio reflejado en una menor área bajo la curva de G2/M en células tratadas con ácido oleico ($p < 0,05$). La adición de ácido eláidico 10 μ M aumentó el número de células en G2/M, siendo las diferencias significativas con respecto al control a 6 h, 12 h, 18 h ($p < 0,01$) y con respecto al tratamiento con ácido oleico a las 6 h ($p < 0,01$), 12 h ($p < 0,01$), 18 h ($p < 0,05$), 24 h ($p < 0,01$), 30 h ($p < 0,05$) y 36 h ($p < 0,05$). El tratamiento con ácido esteárico también produjo un aumento de la tasa de células en G2/M, obteniéndose diferencias significativas con el control a las 6 h ($p < 0,01$), 12 h ($p < 0,01$), 18 h ($p < 0,01$), 30 h ($p < 0,05$) y con las células tratadas con ácido oleico también a las 6 h ($p < 0,01$), 12 h ($p < 0,01$), 18 h ($p < 0,05$) y 30 h ($p < 0,01$). El aumento del número de células en G2/M que indujo el tratamiento con ácido eláidico ó esteárico hizo que el AUC (Figura 34 A) de G2/M fuera mayor que en el control ($p < 0,01$) y que en células tratadas con ácido oleico ($p < 0,01$).

Tabla 8: Porcentajes de células en la fase G2/M del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M, ácido eláidico 10 μ M y ácido esteárico 10 μ M cultivadas en presencia de medio completo.

G2/M

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FCS	20,19	25,63	23,04	24,19	21,36	21,07	20,70	19,96
Ácido oleico 10% FCS	17,01	20,04**	22,75	21,02	17,82*	19,47	19,75	18,50
Ácido eláidico 10% FCS	28,67** $\Delta\Delta$	29,77** $\Delta\Delta$	27,72** $\Delta\Delta$	26,77 $\Delta\Delta$	23,07 Δ	23,73 Δ	23,27	20,55
Ácido esteárico 10% FCS	25,48** $\Delta\Delta$	31,14** $\Delta\Delta$	27,71** $\Delta\Delta$	24,29	25,64** $\Delta\Delta$	22,68	20,36	20,87

* Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$, $n = 4$).

** Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$, $n = 4$).

Δ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

$\Delta\Delta$ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

En condiciones de restricción de nutrientes (Tabla 9, Figura 33 F), en células control la tasa de células en fase G2/M aumentó desde las 6 h (17,43%) hasta las 12 h (21,88%) y después disminuyó paulatinamente a medida que transcurrió el tiempo de cultivo. El ácido oleico provocó un aumento del número de células en fase G2/M desde las 6 h (14,76%) hasta las 24 h (19,32%), a partir de las 24 h se mantuvo estable en el tiempo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control a las 12 h y a las 42 h ($p < 0,05$). En células tratadas con ácido eláidico 10 μ M, se detectó un aumento desde las 6 h (19,61%) hasta las 12 h (23,03%) de cultivo, después el porcentaje de la población en G2/M disminuyó hasta las 36 h (14,43%), siendo los valores superiores con respecto control hasta las 30 h, observándose diferencias significativas a las 18 h y 30 h ($p < 0,05$). La tasa de células en G2/M fue mayor que en células tratadas con ácido oleico a las 6 h y 12 h ($p < 0,05$). En células tratadas con ácido esteárico 10 μ M, el porcentaje de células en G2/M también aumentó desde las 6 h hasta las 12 h, siendo mayor que en células control y que en células cultivadas con ácido oleico, observándose diferencias significativas con respecto al control a las 6 h y 12 h ($p < 0,05$) y con respecto a células tratadas con ácido oleico a las 12 h ($p < 0,01$). A partir de las 12 h la población en G2/M disminuyó drásticamente hasta las 42h de cultivo (8,75%), siendo las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control a las 36 h y 42 h ($p < 0,01$), con respecto a células tratadas con ácido oleico a las 36 h, 42 h ($p < 0,01$) y 48 h ($p < 0,05$) y con respecto a células cultivadas con ácido eláidico a las 30 h y 42h ($p < 0,01$). La disminución de la población en G2/M que se produjo desde las 12 h, hizo que el AUC de G2/M en células tratadas con ácido esteárico (Figura 34 B) fuera menor que la obtenida en el resto de tratamientos, obteniéndose diferencias significativas con el AUC de células tratadas con ácido eláidico ($p < 0,05$).

Tabla 9: Porcentajes de células en la fase G2/M del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M, ácido eláidico 10 μ M y ácido esteárico 10 μ M cultivadas en presencia de medio restrictivo de nutrientes.

G2/M

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	17,43	21,88	19,02	18,21	16,20	15,68	15,29	16,02
Ácido oleico 0,5% FCS	14,76	17,66*	18,42	19,32	18,18	18,16	19,72*	18,55
Ácido eláidico 0,5% FCS	19,61 Δ	23,03 Δ	22,87*	18,86	20,05*	14,43	15,85	17,45
Ácido esteárico 0,5% FCS	20,25*	26,22* $\Delta\Delta$	20,16	15,98	14,11 $\square\square$	10,74** $\Delta\Delta$	8,75** $\Delta\Delta\square\square$	13,28 Δ

* Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$, $n = 4$).

** Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$, $n = 4$).

Δ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

$\Delta\Delta$ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

$\square\square$ Diferencias significativas del ácido eláidico vs ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

G0/G1

En condiciones óptimas de nutrientes (Tabla 10, Figura 33 C) en células cultivadas con ácido oleico, se observó una disminución del porcentaje de células en G0/G1 hasta las 18 h, mientras que en el control y en células tratadas con ácido eláidico ó con ácido esteárico se produce una disminución hasta las 24 h siendo las diferencias significativas a las 24 h entre el control y las células tratadas con ácido oleico ($p < 0,01$) y entre las células tratadas con ácido oleico y las células cultivadas con ácidos grasos tipo B ($p < 0,01$). Posteriormente aumentó de nuevo la tasa de células en G0/G1. El análisis del AUC (Figura 34 A) mostró que el tratamiento con ácido oleico indujo una mayor AUC de la fase G0/G1 que en células control ($p < 0,05$), mientras que los ácidos grasos tipo B no presentan diferencias con el control pero sí con células cultivadas con ácido oleico siendo significativamente menor en los ácidos grasos tipo B.

Tabla 10: Porcentajes de células en la fase G0/G1 del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M, ácido eláidico 10 μ M y ácido esteárico 10 μ M cultivadas en presencia de medio completo.

G0/G1

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10 % FCS	62,80	55,63	51,62	48,45	54,23	58,57	59,33	60,11
Ácido oleico 10% FCS	66,46*	57,72	52,00	56,54**	56,59	60,61	59,33	59,96
Ácido eláidico 10% FCS	57,46** $\Delta\Delta$	53,85	52,35	47,30 $\Delta\Delta$	54,58	53,13** $\Delta\Delta$	61,06	61,58
Ácido esteárico 10% FCS	59,49 $\Delta\Delta$	52,47* Δ	49,13	50,31 $\Delta\Delta$	54,31	56,70	60,90	60,65

* Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$, $n = 4$).

** Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$, $n = 4$).

Δ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

$\Delta\Delta$ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

En células serodeprivadas control (Tabla 11, Figura 33 G) se produjo una disminución de la población en estado de quiescencia desde un 64,75% las 6 h hasta un 32,89% a las 42 h. Sin embargo en células tratadas con ácido oleico 10 μ M se observó una menor disminución en el porcentaje de células en la fase G0/G1 desde un 67,82% hasta un 48,70% a las 6 h y 24 h respectivamente, posteriormente se observó un ligero aumento hasta las 42 h, obteniéndose diferencias significativas con el control a las 30 h, 36 h y 42 h ($p < 0,01$). Cuando se analizó la variación de esta fase del ciclo celular en cultivos serodeprivados tratados con ácido eláidico, se observó que produjo una menor disminución de la población en G0/G1 que el control, pero mayor que la producida por ácido oleico; disminuye desde un 63,18% a las 6 h de tratamiento hasta un 47,52% a las 36 h y posteriormente aumentó siendo las diferencias significativas con respecto al control a las 36 h, 42 h y 48 h ($p < 0,01$). En el caso del ácido esteárico, se observó una disminución de las células en esta fase mayor que la que se obtuvo en el control y que en

células tratadas con ácido oleico ó ácido elaídico, observándose diferencias significativas con respecto al control a las 36 h ($p < 0,01$), 48 h ($p < 0,05$), con respecto al ácido oleico a las 30 h, 36 h, 42 h, 48 h ($p < 0,01$) y con respecto al ácido elaídico a las 30 h ($p < 0,05$), 36 h, 42 h y 48 h ($p < 0,01$). El AUC de la fase G0/G1 (Figura 34 B) fue mayor que en el control en células tratadas con ácido oleico y también en células cultivadas con ácido elaídico ($p < 0,01$). Sin embargo el ácido esteárico produjo una menor AUC que el resto de tratamientos ($p < 0,01$).

Tabla 11: Porcentajes de células en la fase G0/G1 del ciclo celular en células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M, ácido elaídico 10 μ M y ácido esteárico 10 μ M cultivadas en presencia de medio restrictivo de nutrientes.

G0/G1

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	64,75	57,58	52,35	48,13	44,55	39,48	32,89	42,17
Ácido oleico 0,5% FCS	67,82	60,30	52,55	48,70	53,65**	53,01**	54,24**	47,62
Ácido elaídico 0,5% FCS	63,18	59,49	51,55	49,46	48,61	47,52**	50,54**	57,77** $\Delta\Delta$
Ácido esteárico 0,5% FCS	63,31	57,41	51,87	49,67	39,93 $\Delta\Delta\Box$	30,79** $\Delta\Delta\Box\Box$	33,76 $\Delta\Delta\Box\Box$	35,45* $\Delta\Delta\Box\Box$

* Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$, $n = 4$).

** Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$, $n = 4$).

Δ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido elaídico y ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

$\Delta\Delta$ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido elaídico y ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

\Box Diferencias significativas del ácido elaídico vs ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

$\Box\Box$ Diferencias significativas del ácido elaídico vs ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

Apoptosis

En células cultivadas en presencia de medio completo (Tabla 12, Figura 33 D), la tasa de apoptosis se mantuvo baja durante todos los tiempos de cultivo en todos los tratamientos. No se observaron diferencias en el área bajo la curva entre las células tratadas con ácido oleico, elaídico ó esteárico y entre el control (Figura 34 A).

Tabla 12: Porcentaje de apoptosis en células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M, ácido elaídico 10 μ M y ácido esteárico 10 μ M, cultivadas en presencia de medio completo.

APOPTOSIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 10% FCS	1,65	2,29	6,15	6,68	9,54	4,93	5,25	4,00
Ácido oleico 10% FCS	2,45	3,67	5,81	5,86	9,34	5,24	4,37	5,11
Ácido elaídico 10% FCS	0,88	0,62	3,10	3,18*	6,51	6,56	2,62	1,22 Δ
Ácido esteárico 10% FCS	0,93	0,74	4,24	3,14*	4,34** Δ	5,59	6,34	1,22 Δ

* Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$, $n = 4$).

** Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$, $n = 4$).

Δ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido elaídico y ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

En condiciones de restricción de nutrientes (Tabla 13, Figura 33 H), el ácido oleico ejerció un efecto protector frente a la muerte celular por apoptosis estadísticamente significativo desde las 30 h de cultivo ($p < 0,01$), alcanzándose la máxima protección a las 42 h que resultó ser de un 64,84% con respecto al control. El ácido elaídico también protegió frente la apoptosis aunque en menor medida que el ácido oleico; se obtuvieron diferencias significativas desde las 30 h de cultivo con respecto al control siendo a las 42 h la protección de un 39,36% ($p < 0,01$). A las 36 h y 42 h, se observaron diferencias significativas en la tasa de apoptosis entre las células preincubadas con ácido elaídico y con ácido oleico, siendo el porcentaje de apoptosis sobre un 10% menor en células tratadas con ácido oleico. El tratamiento con ácido esteárico, no protegió frente la apoptosis celular, sino que presentó un efecto pro-apoptótico desde las 30 h de cultivo, obteniéndose una inducción de la apoptosis del 44,87% a las 36 h con respecto al control y con respecto al ácido oleico a las 36 h y 42 h, la tasa de apoptosis fue el triple. Esto

se vio reflejado el área bajo la curva de apoptosis (Figura 34 B); la mayor área se obtuvo con el ácido esteárico, observándose diferencias significativas ($p < 0,01$) con respecto al control y a células tratadas con ácido eláidico ó ácido oleico.

Tabla 13: Porcentaje de apoptosis en células control y células tratadas con ácido oleico 10 μ M, ácido eláidico 10 μ M y ácido esteárico 10 μ M, cultivadas en presencia de medio restrictivo de nutrientes.

APOPTOSIS

Tratamiento	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
Control 0,5% FCS	3,22	4,55	12,22	17,36	26,55	35,19	42,98	33,95
Ácido oleico 0,5% FCS	2,90	5,02	9,53	11,32	12,61**	16,98**	15,11**	21,85**
Ácido eláidico 0,5% FCS	2,68	1,63	6,07	14,21	18,34*	28,91 $\Delta\Delta$	26,06** Δ	18,46**
Ácido esteárico 0,5% FCS	1,71	0,72	10,29	22,14 Δ	36,76** $\Delta\Delta\Box\Box$	50,98** $\Delta\Delta\Box\Box$	51,42* $\Delta\Delta\Box\Box$	45,09** $\Delta\Delta$

* Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$, $n = 4$).

** Diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$, $n = 4$).

Δ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,05$, $n = 4$).

$\Delta\Delta$ Diferencias significativas del ácido oleico vs ácido eláidico y ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

$\Box\Box$ Diferencias significativas del ácido eláidico vs ácido esteárico ($p < 0,01$, $n = 4$).

El ácido oleico presentó un efecto protector a partir de las 30 h de cultivo, aproximadamente del 50% frente la apoptosis con respecto al control en condiciones de déficit de nutrientes. El ácido eláidico también protegió frente la apoptosis, pero en menor medida que el ácido oleico (aproximadamente un 20% menos) y el ácido esteárico presentó un efecto pro-apoptótico.

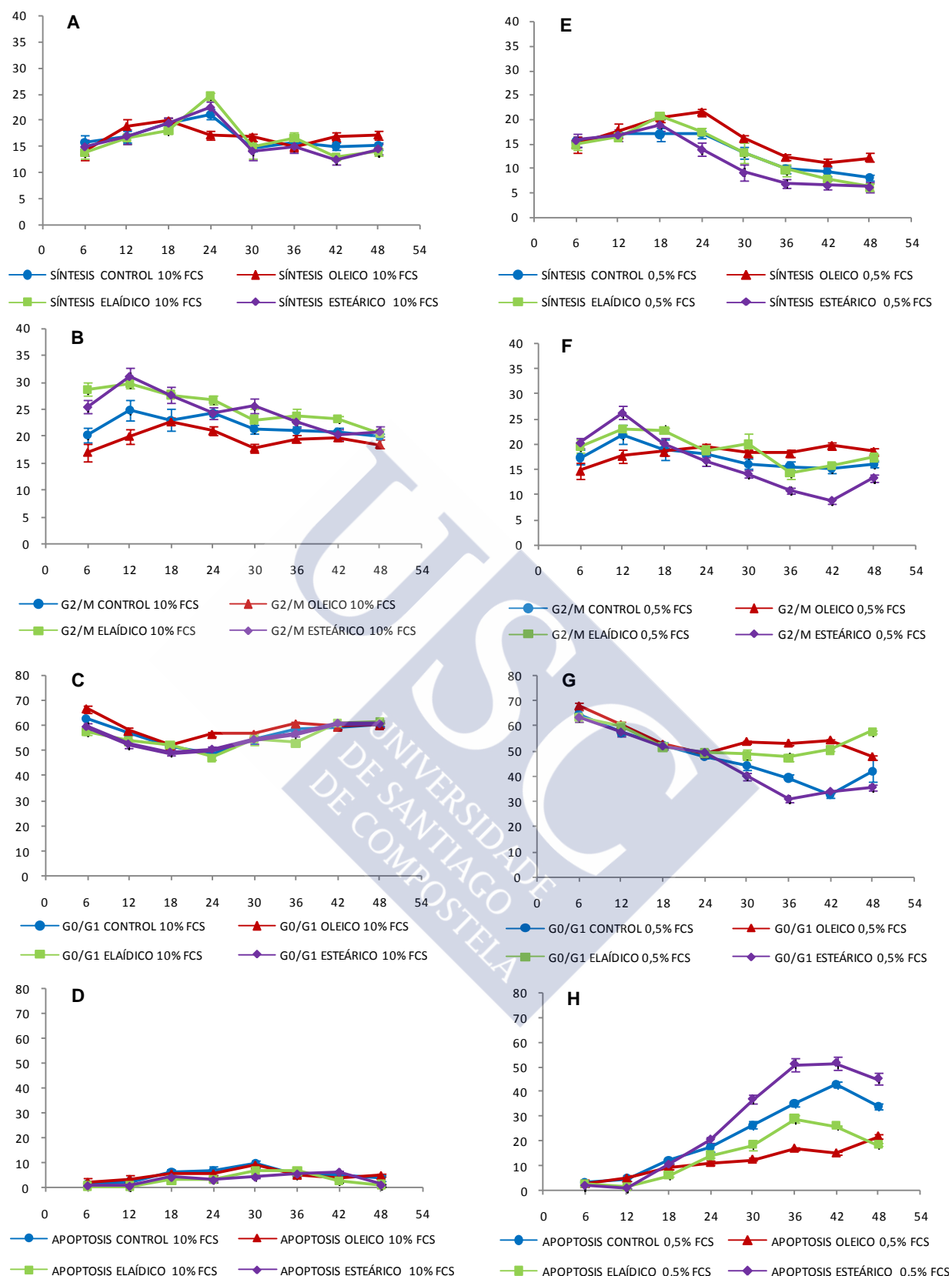


Figura 33: Ciclo celular en células cultivadas en presencia de medio completo y en condiciones de serodeprivación. Las gráficas representan el porcentaje de población celular en las fases S, G2/M, G0/G1 y apoptosis del ciclo celular a diferentes tiempos (h) en células control, y en células tratadas con ácido oleico 10 µM, ácido eláidico 10 µM, ácido esteárico 10 µM. Los datos muestran la media ± EEM de 4 experimentos independientes.

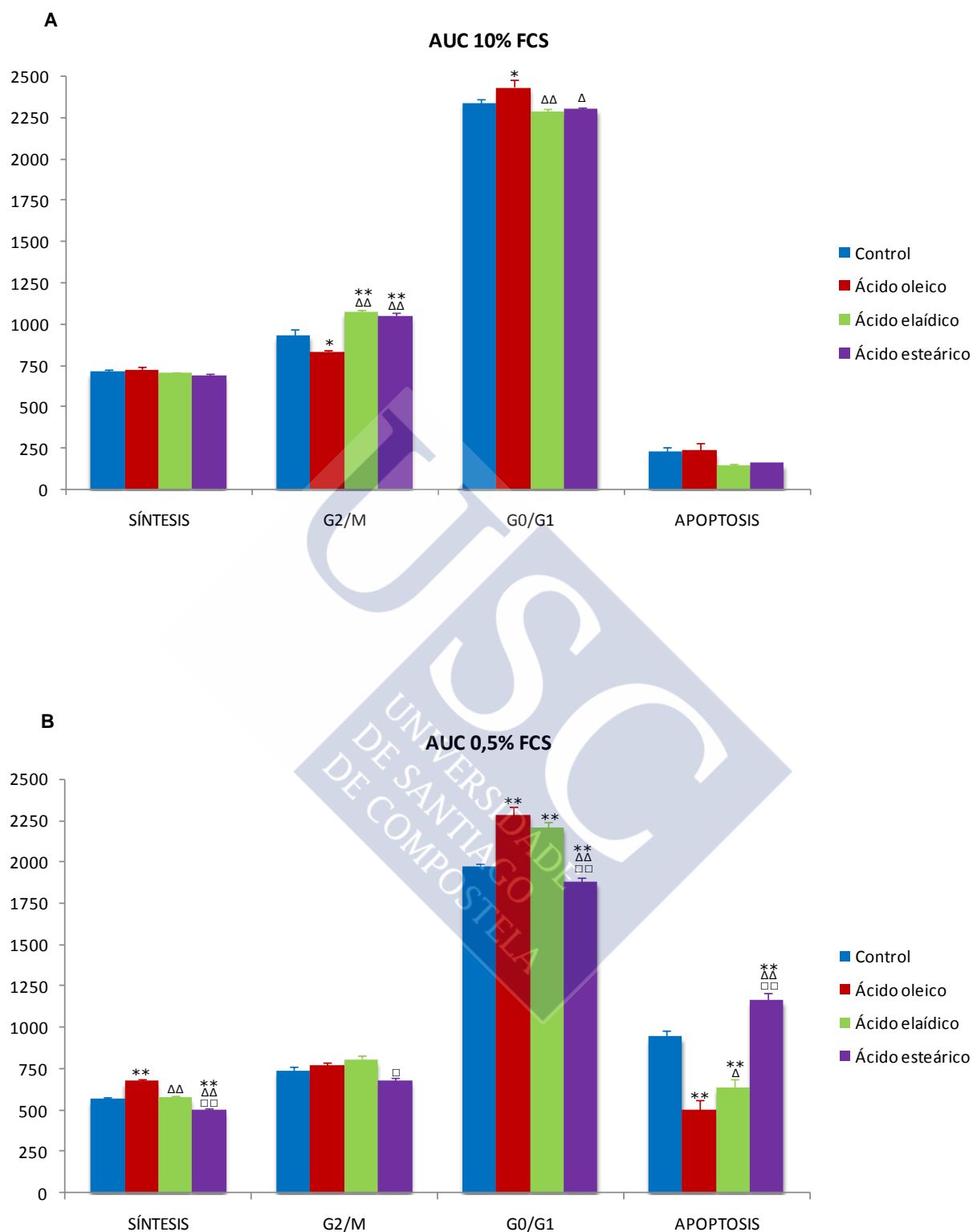


Figura 34: Áreas bajo la curva de las fases S, G2/M, G0/G1 y apoptosis del ciclo celular, (A) en células cultivadas en medio completo, (B) en células serodeprivadas. Los datos muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA): (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, control vs. ácido oleico, ácido elaídico, ácido esteárico; $\Delta\Delta$ $p < 0,01$, Δ $p < 0,05$ ácido oleico vs. ácido elaídico, ácido esteárico; $\square\square$ $p < 0,01$, \square $p < 0,05$ ácido elaídico vs. ácido esteárico).

4.8-Efecto sobre la fluidez de membrana del ácido oleico, elaídico y esteárico

El efecto de los ácidos grasos de tipo A y B sobre la fluidez de membrana en células endoteliales MS-1, se estudió mediante anisotropía de fluorescencia usando como sonda DPH. Esta molécula se incorpora en la región apolar de la membrana y su movimiento rotacional va a depender de la rigidez de la misma. Un aumento de la fluidez de la membrana va a provocar un aumento de la difusión rotacional de la sonda, lo que se traduce en una disminución de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario.

Para observar el efecto de los ácidos oleico, elaídico y esteárico sobre la fluidez de membrana, éstos se añadieron a los 300 segundos de iniciado el registro experimental, a concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 50 o 100 μM , tras lo que se realizaron mediciones de anisotropía durante 900 segundos.

La adición de ácido oleico (*cis*-insaturado) a las células endoteliales MS-1 (Figura 35 A), provocó una disminución estadísticamente significativa de la anisotropía de fluorescencia. Esta disminución fue proporcional a la concentración de ácido oleico administrado a las células. A medida que se añadieron concentraciones crecientes, la sonda aumentó su movimiento rotacional en la membrana (Figura 35 B). Este aumento de la difusión rotacional de la sonda, está directamente relacionado con un aumento de la fluidez. El tratamiento con ácido elaídico (*trans*-insaturado), también aumentó significativamente la fluidez de las membranas celulares en células endoteliales MS-1 (Figura 36 A, B), aunque este aumento fue aproximadamente la mitad del observado con ácido oleico para las mismas concentraciones de ácido graso (como ejemplo de esto, para la mayor concentración de ácido graso utilizada, se puede observar en las Figuras 35 A y 36 A un aumento de la fluidez de un 38,46% para el ácido elaídico, mientras que para el ácido oleico fue de un 73,07%). Sin embargo la adición de concentraciones crecientes de ácido esteárico (saturado) a las células endoteliales MS-1 (Figura 37 A), no provocó cambios estadísticamente significativos en la fluidez de la membrana en el rango de concentraciones de 5 a 50 μM , aunque se observó una pequeña pero significativa disminución de la fluidez (aumento de la rigidez) a la mayor concentración utilizada (Figura 37 B).

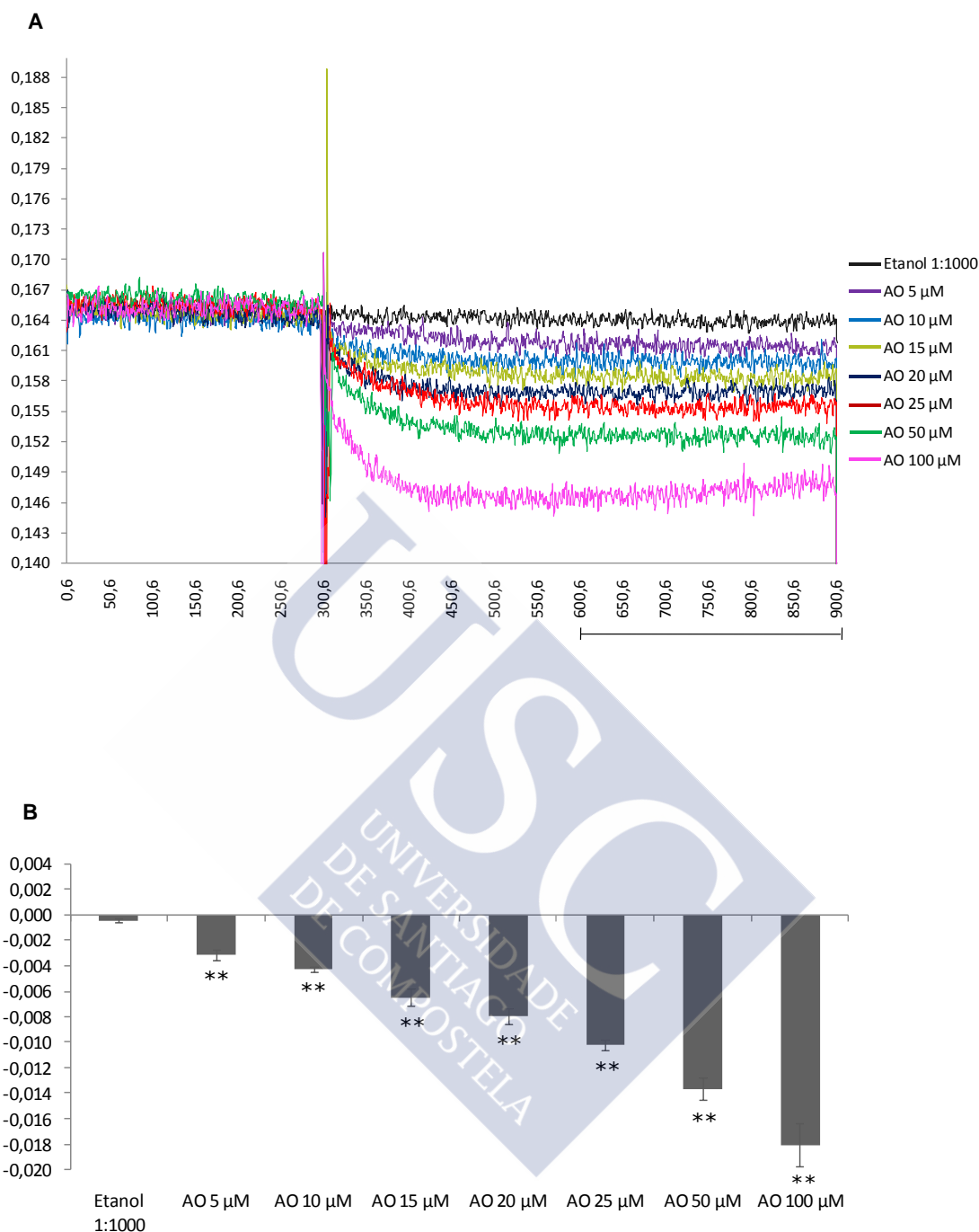


Figura 35: (A) Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1 durante 900 segundos, en función de la concentración de ácido oleico añadida a los 300 segundos. Como control se utilizó etanol 1:1000. Cada punto de anisotropía corresponde a la media de 4 experimentos independientes. (B) Variación de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1, con respecto a la concentración de ácido oleico. Los datos muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. Se representa la media de la anisotropía de 600 a 900 segundos (____ señal estabilizada) menos la media de la anisotropía de 0 a 300 segundos. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** $p < 0,01$, control vs. ácido oleico).

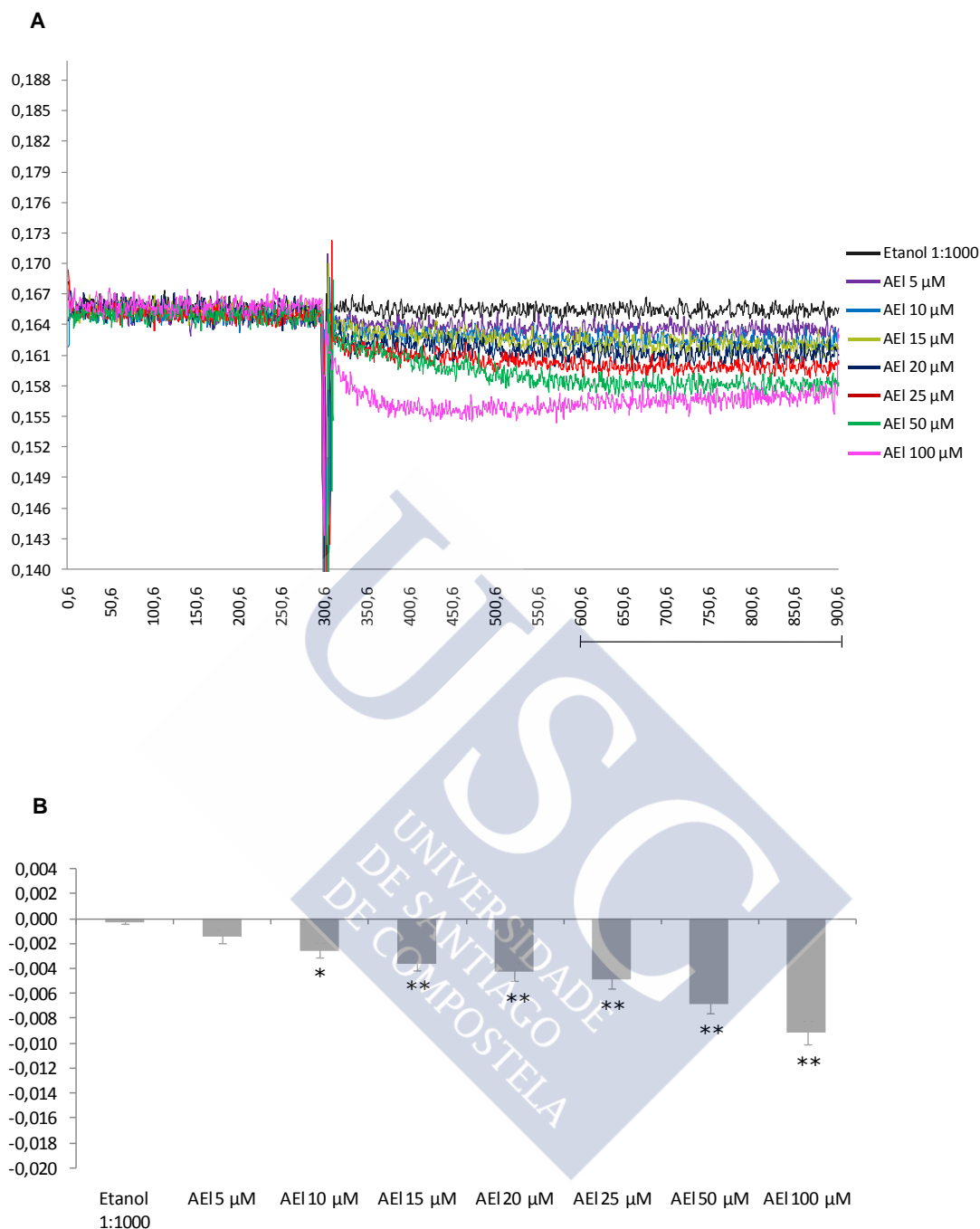


Figura 36: (A) Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1 durante 900 segundos, en función de la concentración de ácido eláídico añadida a los 300 segundos. Como control se utilizó etanol 1:1000. Cada punto de anisotropía corresponde a la media de 4 experimentos independientes. (B) Variación de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1, con respecto a la concentración de ácido eláídico. Los datos muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. Se representa la media de la anisotropía de 600 a 900 segundos (— señal estabilizada) menos la media de la anisotropía de 0 a 300 segundos. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, control vs. ácido eláídico).

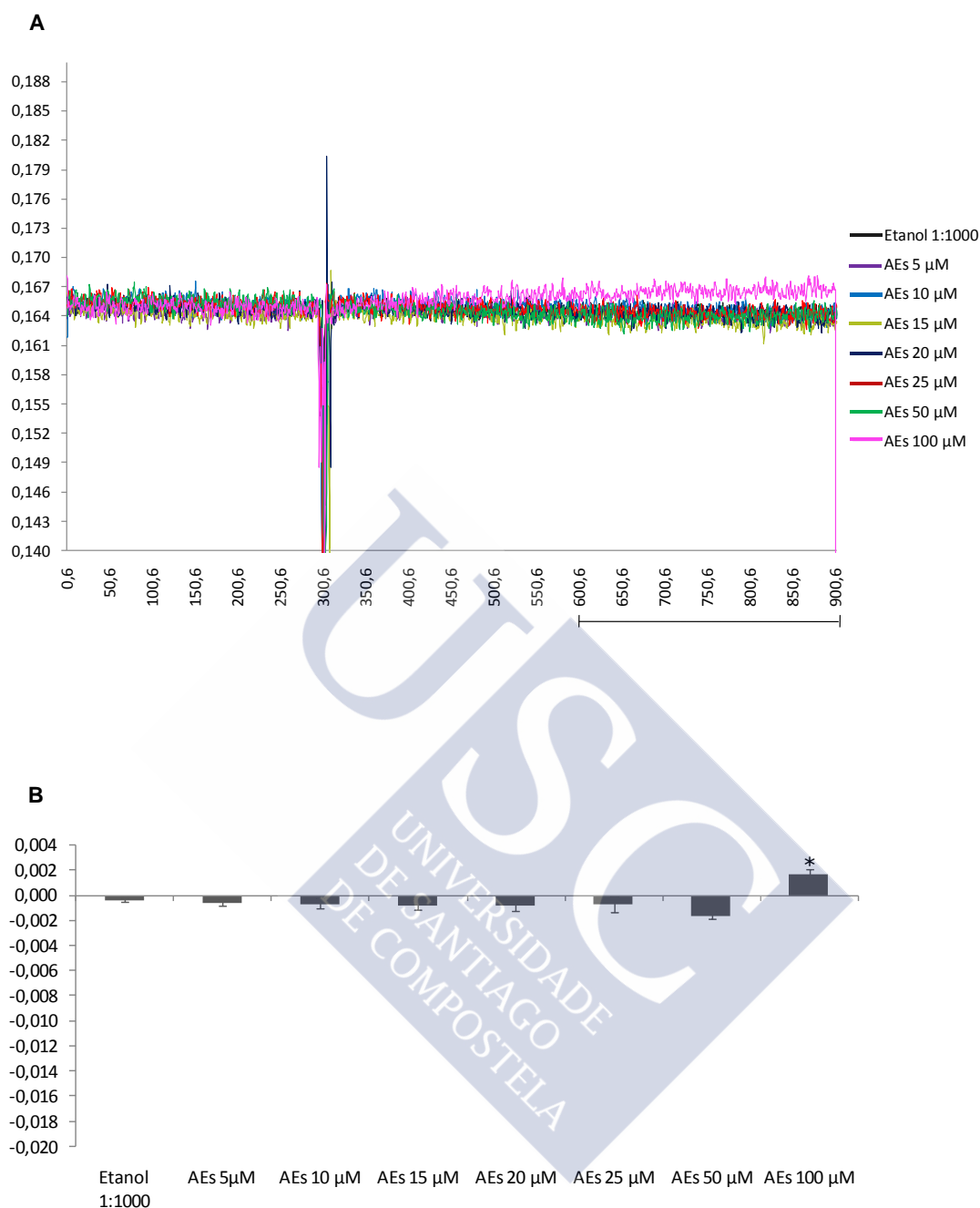


Figura 37: (A) Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1 durante 900 segundos, en función de la concentración de ácido esteárico añadida a los 300 segundos. Como control se utilizó etanol 1:1000. Cada punto de anisotropía corresponde a la media de 4 experimentos independientes. (B) Variación de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1, con respecto a la concentración de ácido esteárico. Los datos muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. Se representa la media de la anisotropía de 600 a 900 segundos (— señal estabilizada) menos la media de la anisotropía de 0 a 300 segundos. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (* $p < 0,05$, control vs. ácido esteárico).

4.9-Efecto del suero fetal bovino sobre la fluidez de membrana

Los ácidos grasos libres son poco solubles en agua. En el plasma la mayoría circulan formando complejos con la albúmina, de forma que aumentan su límite de solubilidad. Sin embargo, en los experimentos de fluorescencia presentados hasta ahora, los ácidos grasos se añaden a las células en un medio puramente acuoso, que no contiene proteínas séricas. Podría alegarse que este sistema es poco fisiológico, ya que *in vivo* las células endoteliales interaccionan con los ácidos grasos en el seno del plasma sanguíneo, que contiene una enorme variedad de proteínas, especialmente albúmina sérica, que actúa entre otras cosas como molécula transportadora de múltiples sustancias hidrofóbicas, entre ellas los ácidos grasos. Por otra parte, el FCS utilizado contiene de forma natural altas cantidades de colesterol y de ácidos grasos saturados e insaturados [1 mmol/l de colesterol y 2,3 mmol/l de ácidos grasos (Dias and Parsons 1995) de los cuales, en promedio, un 57,06 % son ácidos grasos saturados y un 42,94 % son ácidos grasos insaturados (Audi, Mesa et al. 2007)]. Estas consideraciones nos llevaron a diseñar experimentos de control para evaluar si los efectos observados para los ácidos grasos se modificaban significativamente cuando su administración a las células se realizaba en presencia de proteínas séricas.

Para ello, los experimentos de fluidez se recomprobaron variando el diseño experimental, de forma que los ácidos grasos se añadiesen a las células en presencia de FCS completo, o bien en presencia de FCS previamente delipidado (para evaluar el posible efecto de los ácidos grasos incorporados naturalmente con el FCS en nuestro sistema experimental). La delipidación del FCS se realizó siguiendo el protocolo de Cham y Knowles modificado (Cham and Knowles 1976), como se indica en el apartado de materiales y métodos. El FCS delipidado y el FCS se añadieron (sin diluir y a dilución 1:2, 1:4, y 1:8) a células marcadas con DPH a 37 °C en agitación, a los 300 segundos de iniciar la lectura de la anisotropía de fluorescencia. Tras la adición de FCS o de FCS delipidado, se registró la evolución de la anisotropía durante 900 segundos.

Como se muestra en la Figura 38 y en la Figura 39, la adición de FCS a las células endoteliales provocó un aumento de la rigidez de membrana proporcional a la concentración del mismo. Sin embargo, esta disminución de la fluidez no está mediada por los lípidos que pueda incorporar el FCS, ya que no se observaron diferencias en la anisotropía cuando se compara el efecto del FCS con el del FCS previamente delipidado.

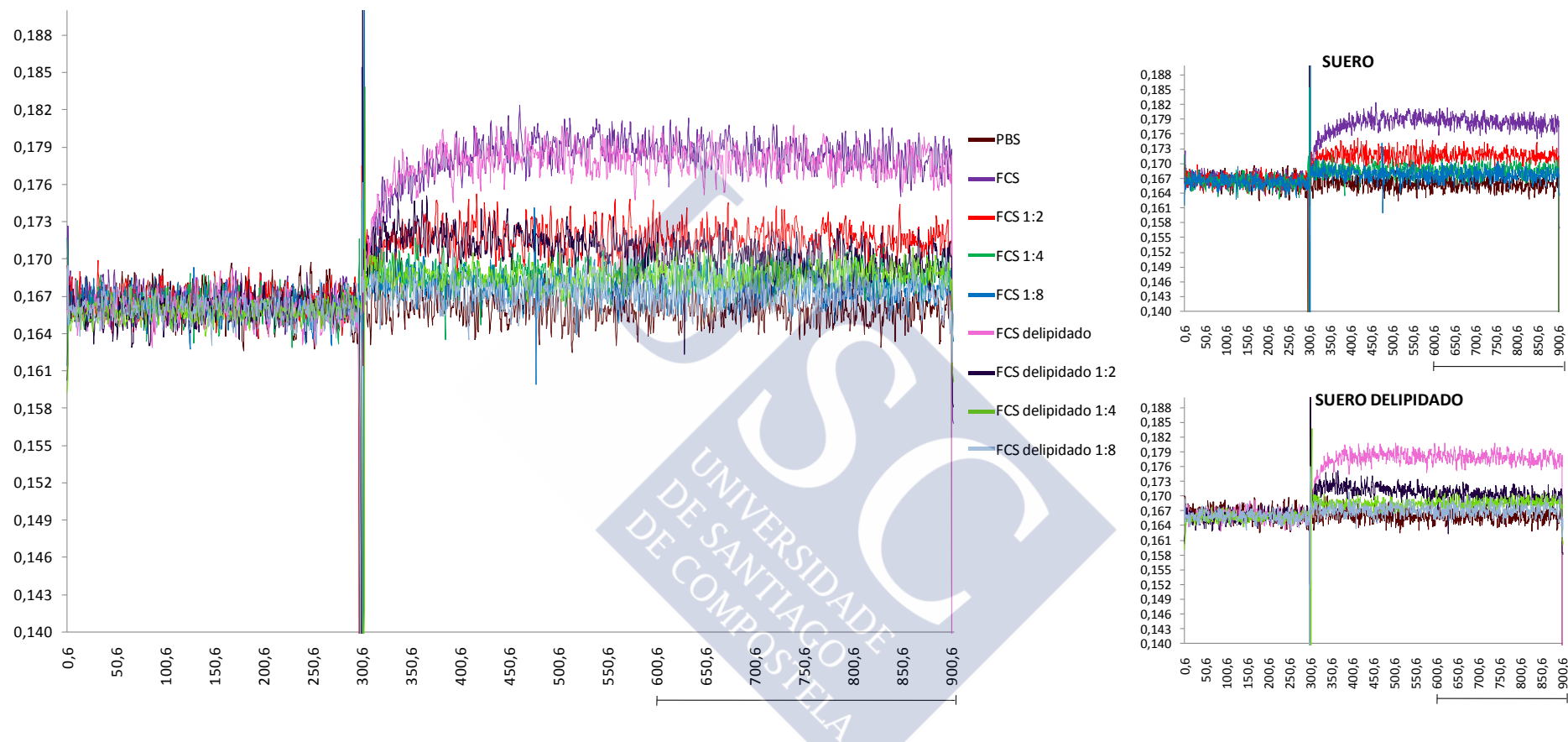


Figura 38: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1 durante 900 segundos, en función de la concentración de FCS y de FCS delipidado añadida a los 300 segundos. Como control se utilizó PBS. (____) Para el análisis de resultados, se usaron los datos obtenidos tras la estabilización de la señal.

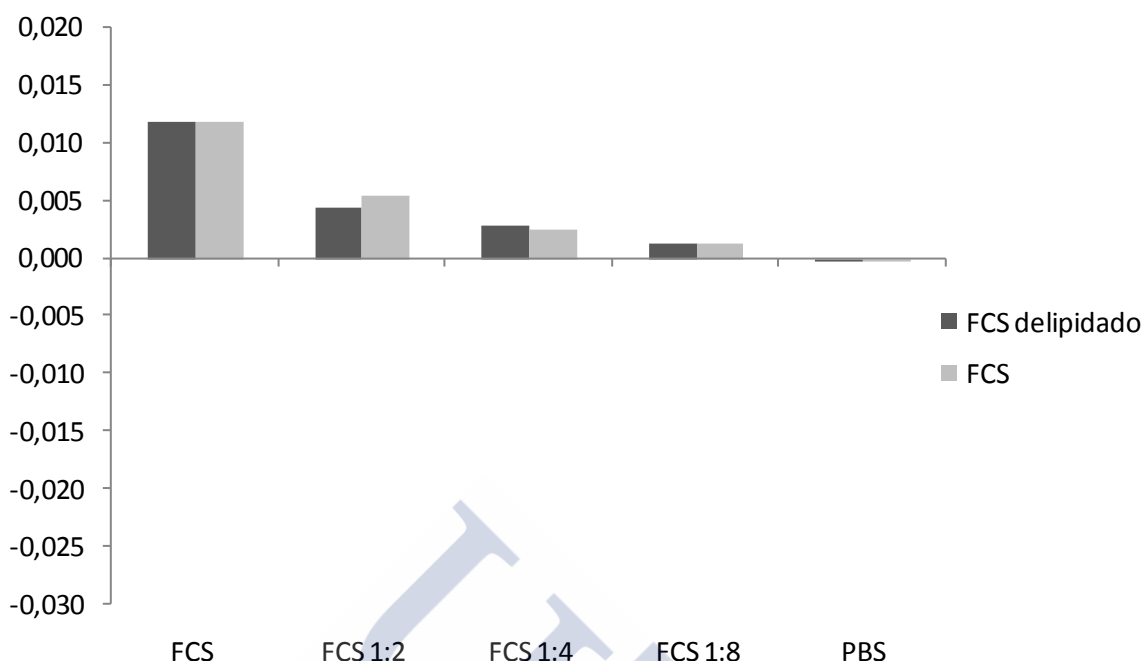


Figura 39: Variación de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1, con respecto a la concentración de FCS.

Una vez comprobado el efecto que el FCS y el FCS delipidado ejercen sobre las determinaciones de anisotropía de fluorescencia, se realizaron experimentos para comprobar si existían diferencias entre los efectos de los ácidos grasos cuando se administraban a las células en ausencia de proteínas séricas (disueltos en etanol), y los efectos de estos mismos ácidos grasos cuando se administraban a las células previamente unidos a la albúmina sérica. Para ello se añadieron al FCS y al FCS delipidado ácido oleico, ácido elaídico y ácido esteárico 100 μM , utilizando como controles etanol y PBS. Estos ácidos grasos se van a unir a la albúmina del FCS y tras la adición a las células marcadas con DPH se intercambian rápidamente con las membranas modificando su fluidez (Figura 40, Figura 41). El FCS enriquecido en ácido oleico 100 μM aumentó la fluidez de las membranas en mayor medida que el FCS enriquecido en ácido elaídico y en ácido esteárico. Idénticos efectos se observaron cuando primero se añadió a los 300 segundos el FCS ó el FCS delipidado a las células marcadas con DPH y a los 800 segundos se añadieron los ácidos grasos o el control (Figura 42). El etanol no modificó la fluidez de la membrana de las células endoteliales MS-1, tanto en células tratadas con FCS como en las expuestas a FCS delipidado. El ácido esteárico provocó un ligero aumento de la fluidez de las membranas con respecto a los controles, mientras que el ácido elaídico aumentó la fluidez de la membrana de forma que se superó la fluidez basal. El tratamiento con ácido oleico (*cis*-insaturado) indujo una fluidificación mayor que la obtenida con el ácido elaídico. En las Figuras 43, 44 y 45 se desglosa el efecto sobre la anisotropía de fluorescencia de (i) FCS, (ii) FCS con ácidos grasos y (iii) ácidos grasos, respectivamente. El tratamiento con FCS ó FCS delipidado disminuyó la fluidez de las membranas en células endoteliales, sin observarse diferencias significativas en las medidas de anisotropía entre ambos. La adición de ácidos grasos al FCS y al FCS delipidado provocó, de forma análoga a lo observado en los experimentos iniciales (en los que los ácidos grasos se añadían a las células en ausencia de proteínas séricas), un aumento de la fluidez con respecto al control, que fue mayor con el ácido oleico, seguido del ácido elaídico y del ácido esteárico.

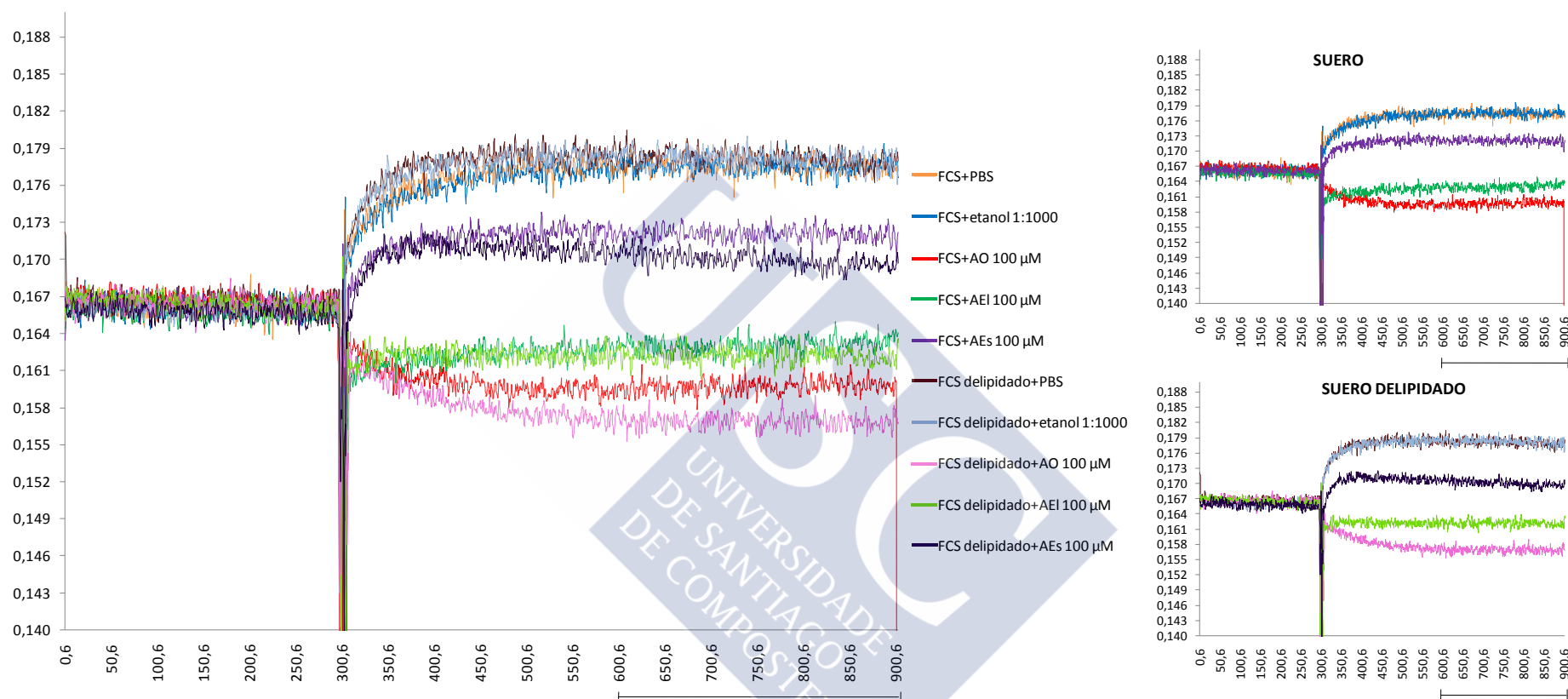


Figura 40: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1 durante 900 segundos. A los 300 segundos se añadió FCS ó FCS delipidado enriquecido con ácidos grasos 100 μM . Como control se utilizaron PBS y etanol 1:1000. Cada punto de anisotropía corresponde a la media de 4 experimentos independientes. (—) Para el análisis de resultados, se usaron los datos obtenidos tras la estabilización de la señal.

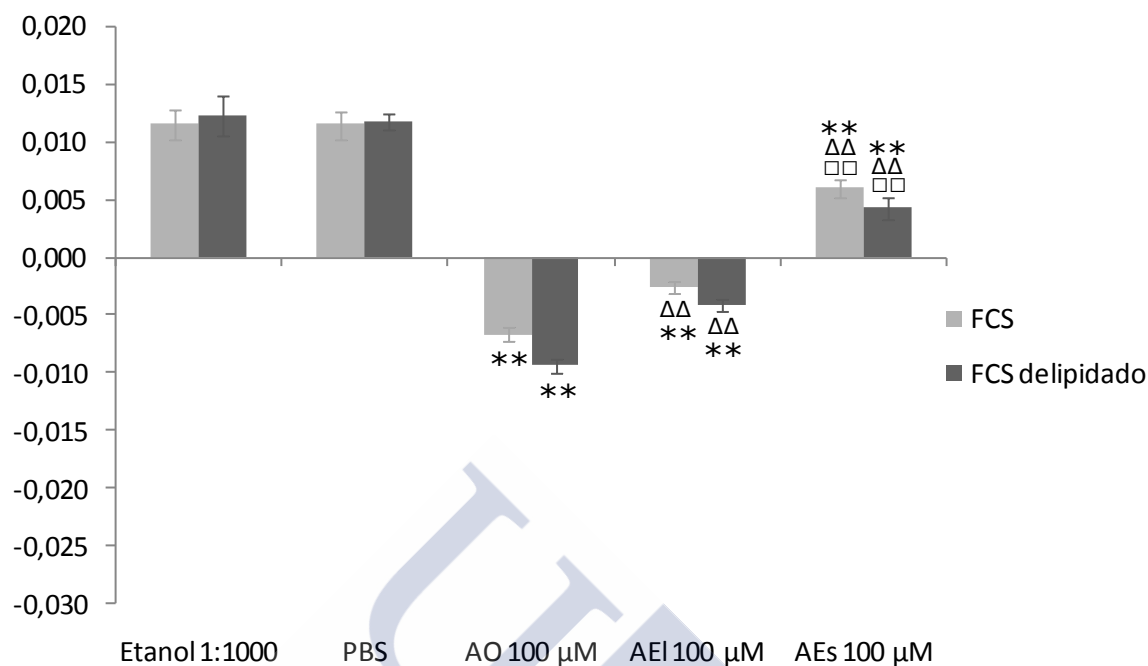


Figura 41: Variación de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1, con respecto al FCS y al FCS delipidado enriquecidos en ácidos grasos 100 µM. Los datos muestran la media ± EEM de 4 experimentos independientes. Se representa la media de la anisotropía de 600 a 900 segundos (señal estabilizada) menos la media de la anisotropía de 0 a 300 segundos. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** $p < 0,01$ FCS con ácido oleico, ácido eláidico, ácido esteárico, FCS delipidado con ácido oleico, ácido eláidico, ácido esteárico vs. control; $\Delta\Delta$ $p < 0,01$ FCS con ácido oleico, FCS delipidado con ácido oleico vs. FCS con ácido eláidico, ácido esteárico, FCS delipidado con ácido eláidico, ácido esteárico; $\square\square$ $p < 0,01$, FCS con ácido eláidico, FCS delipidado con ácido eláidico vs. FCS con ácido esteárico, FCS delipidado con ácido esteárico).

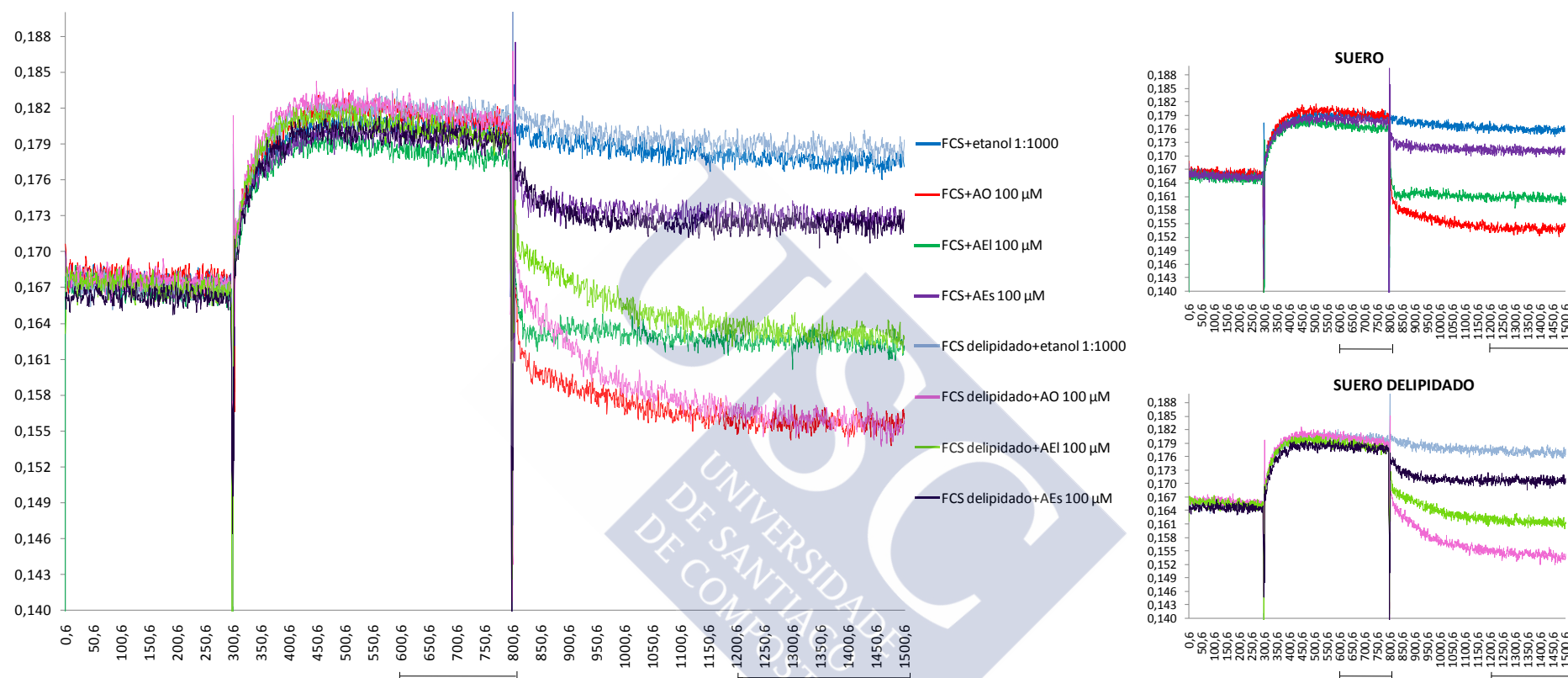


Figura 42: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1 durante 1500 segundos. A los 300 segundos se añadió FCS ó FCS delipidado, y a los 800 segundos se añadieron ácido oleico 100 μ M, ácido elaídico 100 μ M ó ácido esteárico 100 μ M. Como control se usó etanol 1:1000. Cada punto de anisotropía corresponde a la media de 5 experimentos independientes. (____) Para el análisis de resultados, se usaron los datos obtenidos tras la estabilización de la señal.

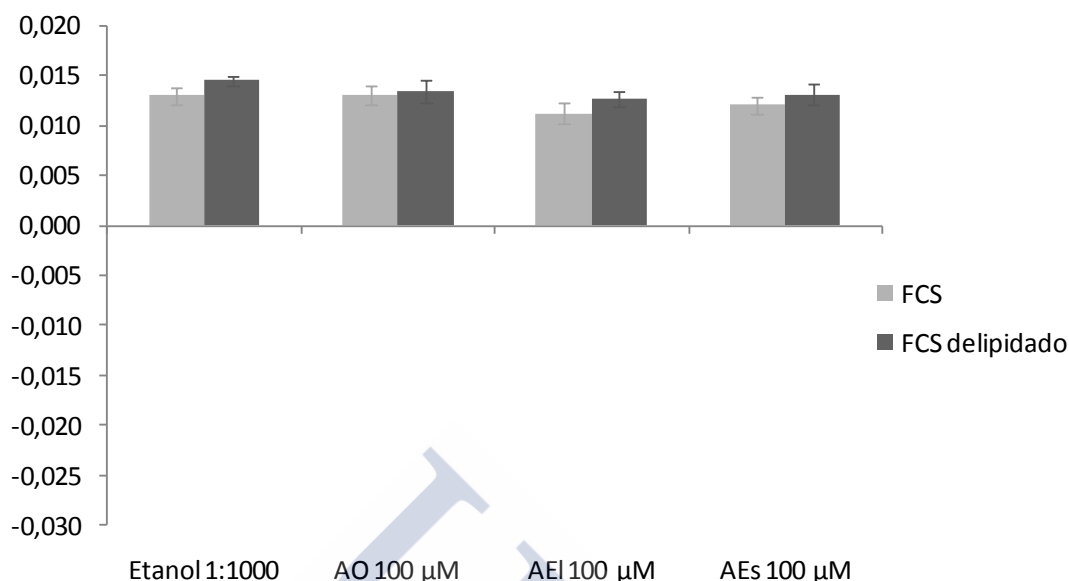


Figura 43: Efecto del FCS y del FCS delipidado sobre la variación de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1, antes de la adición de ácidos grasos. Se representa la diferencia de las medias de la anisotropía de 600 a 800 segundos (señal estabilizada) respecto a las de 0 a 300 segundos \pm EEM. Se realizaron 5 experimentos independientes y la significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA), sin observarse diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

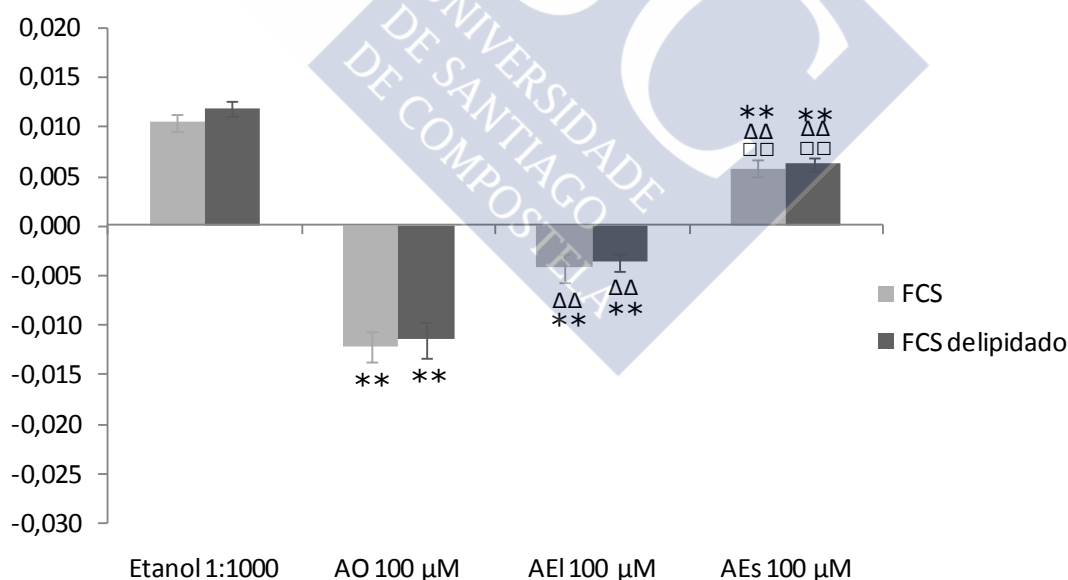


Figura 44: Efecto de la adición de los ácidos grasos después del FCS y del FCS delipidado sobre la variación de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1. Se representa la variación de las medias de la anisotropía entre 1200 a 1500 segundos (señal estabilizada) respecto a las de 0 a 300 segundos \pm EEM. Se realizaron 5 experimentos independientes y la significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** $p < 0,01$ FCS ácido oleico, ácido eláidico, ácido esteárico, FCS delipidado ácido oleico, ácido eláidico, ácido esteárico vs. control; $\Delta\Delta$ $p < 0,01$ FCS ácido oleico, FCS delipidado ácido oleico vs. FCS ácido eláidico, ácido esteárico, FCS delipidado ácido eláidico, ácido esteárico; $\square\square$ $p < 0,01$ FCS ácido eláidico, FCS delipidado ácido eláidico vs. FCS ácido esteárico, FCS delipidado ácido esteárico).

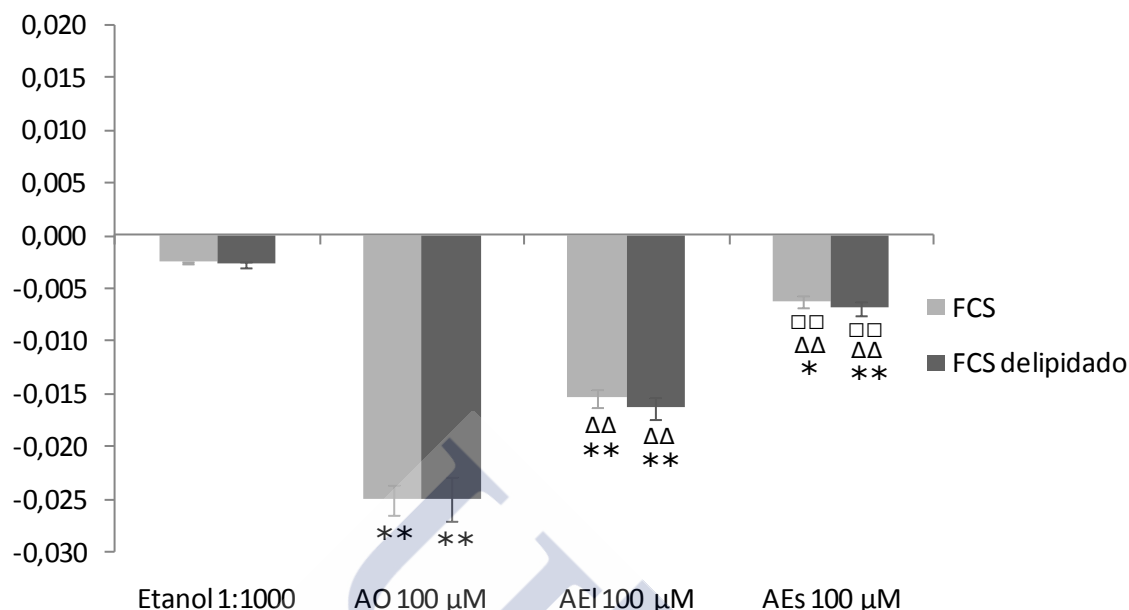


Figura 45: Efecto los ácido grasos sobre la variación de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario del DPH en la membrana de células endoteliales MS-1. Se representa la diferencia de las medias de la anisotropía de 1200 a 1500 segundos (señal estabilizada) respecto a las de 600 a 800 segundos \pm EEM. Se realizaron 5 experimentos independientes y la significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ FCS ácido oleico, ácido elaídico, ácido esteárico, FCS delipidado ácido oleico, ácido elaídico, ácido esteárico vs. control; $\Delta\Delta$ $p<0,01$, FCS ácido oleico, FCS delipidado ácido oleico vs. FBS ácido elaídico, ácido esteárico, FBS delipidado ácido elaídico, ácido esteárico; $\square\square$ $p<0,01$, FCS ácido elaídico, FCS delipidado ácido elaídico vs. FCS ácido esteárico, FCS delipidado ácido esteárico).

Las variaciones de anisotropía inducidas por los ácidos elaídico y esteárico fueron similares, tanto si se administraban premezclados con FCS ó FCS delipidado, como si se añadían tras el tratamiento con FCS ó FCS delipidado. Sin embargo, la variación de anisotropía observada en el caso del ácido oleico fue significativamente mayor cuando se añadió después del FCS que cuando se añadió premezclado con el FCS (Figura 46).

Tal y como se deduce de estos resultados, los efectos de los ácidos grasos sobre la variación de la anisotropía de fluorescencia en la membrana de las células endoteliales fueron cualitativamente idénticos, cuando los ácidos grasos se añadieron directamente sobre las células marcadas con DPH o cuando se añadieron después de añadir FCS ó FCS delipidado, aunque se obtuvo una variación de anisotropía significativamente mayor cuando los ácidos grasos se vehiculizaron en FCS ó FCS delipidado (Figura 47).

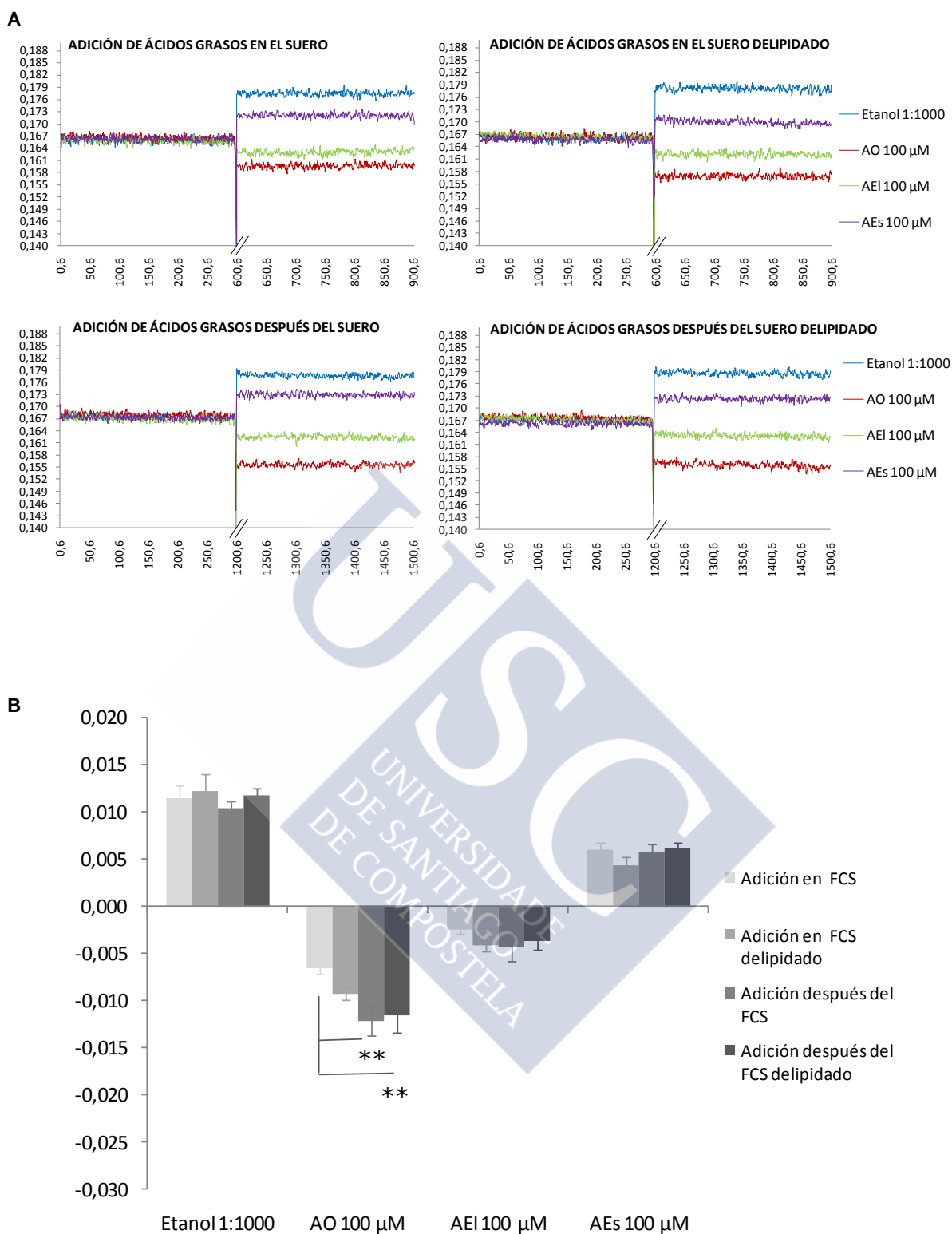


Figura 46: (A) Anisotropía de fluorescencia tras la adición de ácidos grasos en el FCS/FCS delipidado y después del FCS/FCS delipidado. (B) Variación de anisotropía tras la adición de ácidos grasos en el FCS/FCS delipidado y después del tratamiento con FCS/FCS delipidado. Los resultados muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes para la adición de ácidos grasos en el FCS ó FCS delipidado y de 5 experimentos independientes para la adición de ácidos grasos después del FCS ó FCS delipidado. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** $p < 0,01$ adición de los ácidos grasos en FCS vs. adición en FCS delipidado, adición después del FCS, adición después del FCS delipidado).

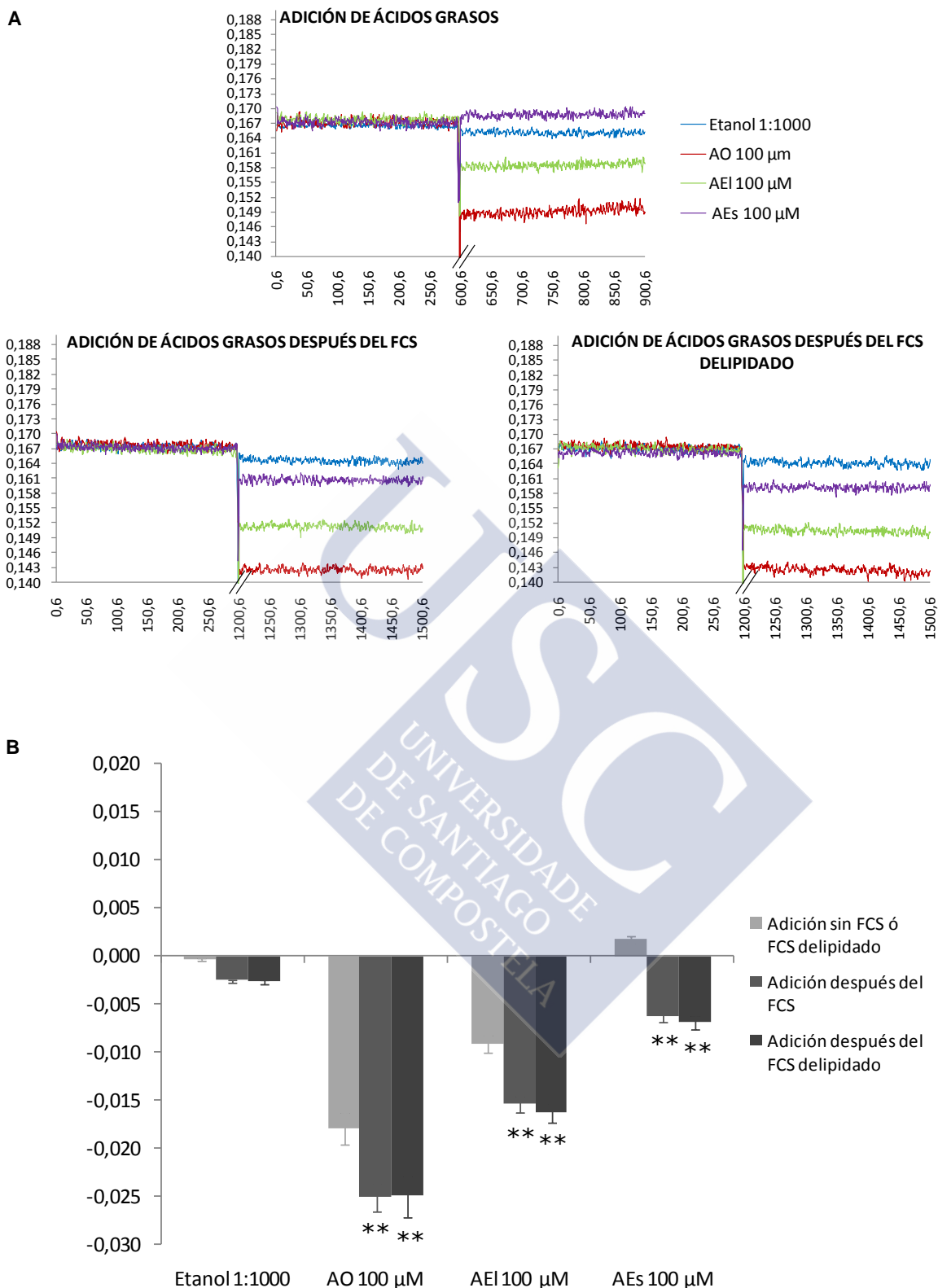


Figura 47: (A) Anisotropía de fluorescencia tras la adición de ácidos grasos sin FCS/FCS delipidado y después del tratamiento con FCS/FCS delipidado. (B) Variación de anisotropía tras la adición de ácidos grasos sin FCS/FCS delipidado y después del tratamiento con FCS/FCS delipidado. Los resultados muestran la media \pm EEM de 4 experimentos independientes para la adición de ácidos grasos en PBS y de 5 experimentos independientes para la adición de ácidos grasos después del FCS ó FCS delipidado. La significación estadística se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). (** $p < 0,01$ adición de los ácidos grasos sin FCS vs adición después del FCS, adición después del FCS delipidado).





DISCUSIÓN



5-DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son responsables de más de 17,3 millones de muertes cada año, siendo la causa más importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (World Health Organization 2007; World Health Organization 2008; World Health Organization 2008; World Health Organization 2009; World Health Organization 2011). En los países industrializados son la principal causa de mortalidad, y solo en países con bajos ingresos económicos las enfermedades infecciosas superan en mortalidad a las ECV (World Health Organization 2011). Así, en Europa, las enfermedades cardiovasculares causan alrededor de 4 millones de muertes al año, lo que supone que son responsables del 47% de la mortalidad (52% en las mujeres y 42% en los varones) (Nichols, Townsend et al. 2012). Aunque la tasa de mortalidad por enfermedad isquémica cardíaca y por enfermedad cerebrovascular está descendiendo en los países con altos ingresos, la tendencia es ascendente en los de ingresos medios y bajos. Se prevé que la mortalidad por enfermedad cardiovascular de forma global seguirá creciendo. Se calcula que en 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas por esta enfermedad, sobre todo por cardiopatías y accidentes vasculares cerebrales y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte (Beaglehole and Bonita 2008; http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/ 2015). Esta epidemia podría limitarse o incluso reducirse con un cambio de la sociedad a un estilo de vida y a una alimentación más sanos como, por ejemplo, la dieta mediterránea, ya que la mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre factores de riesgo, como el consumo de tabaco, las dietas malsanas, la obesidad, la inactividad física, la hipertensión arterial, la diabetes o el aumento de los lípidos, de forma que la prevención podría reducir la morbilidad y mortalidad prematura. Estas intervenciones tienen la ventaja añadida de ser medidas de bajo costo y altamente factibles (Yusuf 2002; Mendis, Puska et al. 2011). Numerosos ensayos clínicos han observado los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea o de sus principales componentes en variables intermedias de riesgo vascular, como presión arterial, perfil lipídico, resistencia a la insulina o función endotelial, hecho que ha añadido plausibilidad a los estudios epidemiológicos al poner de manifiesto posibles mecanismos de protección cardiovascular de la dieta mediterránea (Serra-Majem, Roman et al. 2006). Las perspectivas futuras pueden ser esperanzadoras, gracias en parte a los avances en prevención primaria, pero también gracias a las mejoras continuadas de nuestros conocimientos acerca de la fisiopatología de las ECV.

Existe un amplio consenso en cuanto al efecto beneficioso sobre el riesgo de ECV que se deriva de la modificación del perfil de ácidos grasos contenidos en la dieta. La dieta "ideal" para la prevención de la aterosclerosis tiene como uno de sus pilares básicos la reducción del contenido total de ácidos grasos saturados y poliinsaturados de la dieta, y su sustitución por ácidos grasos de tipo monoinsaturado, fundamentalmente ácido oleico (Garrido and Mata 1994). De hecho, se ha comprobado que existe una correlación inversa entre el consumo de ácidos grasos monoinsaturados y la mortalidad coronaria y general (Keys, Menotti et al. 1986; Garrido and Mata 1994). Esto también se observó en el reciente estudio de intervención nutricional con dieta mediterránea, PREDIMED, el cual demostró que la dieta mediterránea tradicional (caracterizada por su alto contenido en ácido oleico) incrementa la longevidad y ejerce un efecto protector frente a la aparición y el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Además confirmó los efectos beneficiosos de este patrón de alimentación sobre los principales factores de riesgo vascular. El efecto protector se ejerce independientemente de la edad, el género y los factores de riesgo vascular, y es especialmente eficaz en las personas genéticamente susceptibles de sufrir una enfermedad cardiovascular (Estruch 2014).

El mecanismo exacto mediante el cual los ácidos grasos monoinsaturados son capaces de disminuir el riesgo de ECV no se conoce en la actualidad. Existen evidencias, sin embargo, de que este efecto protector depende de la presencia de un doble enlace *cis* en la molécula de ácido oleico, ya que su isómero *trans*, el ácido eláidico, parece tener un efecto hipercolesterolemizante similar al de los ácidos grasos saturados (Garrido and Mata 1994). Esta dependencia respecto de la conformación del doble enlace, que se aprecia para la mayoría de los efectos biológicos de los ácidos grasos, está relacionada con la estructura espacial de estas moléculas. El ácido oleico y otros ácidos grasos *cis*-insaturados (ácidos grasos tipo A)

presentan una acusada angulación en su cadena hidrocarbonada, lo que determina una desestructuración de los dominios lipídicos cuando se integran en las membranas biológicas, perturbando las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína. Por el contrario, tanto los ácidos grasos saturados como los *trans*-insaturados (ácidos grasos tipo B), presentan una conformación lineal que les permite incorporarse a las membranas lipídicas causando poca o ninguna disrupción del ordenamiento de las mismas, por lo que no ejercerían efectos biológicos de importancia sobre la funcionalidad de la membrana (Karnovsky 1979; Casanueva, Villanueva et al. 1987). Así, se ha descrito que los ácidos grasos de tipo A se incorporan rápidamente a las membranas celulares modificando el estado físico-químico de los dominios lipídicos y modificando la actividad de numerosas proteínas de membrana, entre las que se encuentran la fosfolipasa C-gamma, los canales de calcio voltaje sensibles de tipo L, y el sistema adenilato ciclasa-proteín kinasa A (Casabiell, Pandiella et al. 1991; Casabiell, Zugaza et al. 1993; Zugaza, Casabiell et al. 1995; Zugaza, Casabiell et al. 1995a; Perez, Casabiell et al. 1997; Perez, Camina et al. 1997a; Perez, Camina et al. 1998), por lo que pueden modular de forma rápida (en minutos) y reversible la actividad de algunos de los mecanismos de señalización intracelular más importantes, como la vía del IP₃-calcio intracelular y la vía del cAMP/proteín kinasa A (Casabiell, Pandiella et al. 1991; Casabiell, Zugaza et al. 1993; Zugaza, Casabiell et al. 1995; Zugaza, Casabiell et al. 1995a; Perez, Casabiell et al. 1997; Perez, Camina et al. 1997a; Perez, Camina et al. 1998). Además, por su capacidad para particionarse hacia membranas intracelulares, no resulta sorprendente que se hayan detectado también efectos biológicos sobre estructuras y funciones internas de la célula, modulando la proliferación celular por sus efectos a nivel nuclear (Buckman, Chapkin et al. 1990; desBordes and Lea 1995; Zugaza, Casabiell et al. 1995; Lu, Morinelli et al. 1996), y afectando la síntesis, procesamiento y maduración de proteínas de secreción.

Dentro de los mecanismos bioquímicos que explican la relación entre dieta, lípidos plasmáticos y aterogénesis, el endotelio vascular desempeña un papel extraordinariamente importante. Las células endoteliales actúan como interfase entre el plasma y la pared de los vasos sanguíneos, comportándose en condiciones normales como una barrera antitrombótica y antiinflamatoria fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la pared vascular. Se sabe que la disfunción de las células endoteliales juega un importante papel en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis (Behrendt and Ganz 2002; Landmesser, Hornig et al. 2004), y hay evidencias que sugieren que la apoptosis es un fenómeno común en el desarrollo de lesiones, afectando a todos los tipos celulares presentes en la placa aterosclerótica. La distribución espacial de la apoptosis en la placa aterosclerótica no es uniforme, concentrándose con frecuencia en la proximidad de los macrófagos, lo que sugiere que estas células participan en el inicio de la apoptosis (Kockx, De Meyer et al. 1998). Aunque no se conocen los mecanismos que inducen la apoptosis de los macrófagos y de las células musculares lisas, se cree que las partículas de LDL oxidadas están implicadas en este proceso ya que son capaces de inducir la muerte de numerosos tipos celulares (Berliner and Heinecke 1996).

5.1-Estudio del efecto del ácido oleico, eláidico y esteárico sobre el ciclo celular y la inducción de apoptosis en células endoteliales MS-1

En la primera parte del presente trabajo se ha abordado el estudio de los efectos agudos del ácido oleico (un ácido graso *cis*-monoinsaturado), sobre el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación de células MS-1 en cultivo, tanto en condiciones normales de crecimiento (medio completo) como en condiciones de depleción de nutrientes (medio restrictivo) o en situaciones de hipoxia experimental. Se analizó el efecto de este ácido graso sobre el ciclo celular y el crecimiento utilizando estímulos mitogénicos complejos, como concentraciones elevadas de FCS en el medio de cultivo, o utilizando mitógenos específicos con acción sobre el endotelio vascular, como la Endotelina 1 y el VEGF. En determinados experimentos se evaluó también la acción de cantidades equimoleculares de su isómero *trans*-insaturado (ácido eláidico) y del

ácido esteárico (saturado), para determinar si los efectos biológicos observados están relacionados con la conformación espacial del ácido graso.

En numerosos sistemas experimentales, el cultivo de una población celular en ausencia de FCS se asocia con un aumento de la apoptosis (Galli and Fratelli 1993; Hogg, Browning et al. 1999). Esto se ha demostrado también en el presente estudio, comprobándose un marcado incremento de la apoptosis en células endoteliales en función del tiempo cuando se cultivaron en medio restrictivo (0,5% FCS), mientras que cuando se cultivaron en medio completo no se observó variación en la viabilidad celular hasta las 48 horas en cultivo. En condiciones de serodeprivación el tratamiento de las células endoteliales MS-1 con ácido oleico, disminuyó de forma marcada la apoptosis. Esta disminución de la apoptosis con respecto a las células no tratadas con el ácido graso se observa con claridad a partir de las 30 horas de incubación, obteniéndose una reducción de la apoptosis del 64,84% a las 42 horas en los cultivos que fueron suplementados con ácido oleico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en diferentes estudios que demuestran que los factores antiaterogénicos como los estrógenos (Spyridopoulos, Sullivan et al. 1997), los antioxidantes (Abello, Fidler et al. 1994; Haendeler, Zeiher et al. 1996; Dimmeler, Haendeler et al. 1997a), y el flujo (Dimmeler, Haendeler et al. 1996; Dimmeler, Haendeler et al. 1997; Hermann, Zeiher et al. 1997; Dimmeler, Hermann et al. 1999) protegen a las células endoteliales inhibiendo la apoptosis inducida por diferentes estímulos (depleción de factores de crecimiento, TNF α , H₂O₂, LDL oxidadas, endotoxinas).

Además de sus efectos sobre la apoptosis, hemos comprobado que el ácido oleico ejerce otros efectos más sutiles sobre el ciclo celular en células MS-1. Así, en cultivos mantenidos en condiciones de serodeprivación, el tratamiento con ácido oleico de alguna manera mantiene el ciclo celular activo y sincronizado, en contraste con lo que ocurre en los controles, en los que no se aprecia una evolución sincrónica clara del ciclo celular. Cuando las células se incuban en medio completo, la presencia de ácido oleico ocasiona una clara aceleración del ciclo celular, alcanzándose el reclutamiento máximo de la población celular en fase S a las 18 horas en células tratadas con ácido oleico, en contraste con las 24 horas que son necesarias para alcanzar este pico de estimulación en los cultivos control. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la progresión del ciclo celular sería un prerrequisito para inhibición de la apoptosis endotelial (Artwohl, Roden et al. 2004). El aumento de la apoptosis de las células endoteliales asociado a la disminución de la proliferación endotelial junto con la alteración de la morfología y función de las células endoteliales parece ser el elemento clave para el inicio y progresión de enfermedades micro y macrovasculares (Dimmeler and Zeiher 2000; Baumgartner-Parzer and Waldhausl 2001; Dimmeler, Haendeler et al. 2002). Por consiguiente, los efectos observados del ácido oleico sobre el ciclo celular, pueden contribuir a que el ácido oleico atenúe el desarrollo de aterosclerosis. Diversos estudios han demostrado que el ácido oleico inhibe la activación endotelial, es decir la expresión de productos génicos implicados en la adhesión de leucocitos y la aterogénesis temprana (Carluccio, Massaro et al. 1999; Massaro and De Caterina 2002).

A pesar de que el ácido oleico acelera la entrada de las células MS-1 en el ciclo celular, este efecto parece ser compensado en el tiempo, como lo demuestran los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación celular en medio completo, en los que no se detectan diferencias significativas en la proliferación inducida por diferentes dosis de FCS entre células controles y células tratadas con ácido oleico. Sin embargo, en estas mismas condiciones el ácido oleico sí aumenta de forma significativa la potencia de dos péptidos con actividad mitogénica sobre células endoteliales como el VEGF y la ET-1, utilizados ambos a dosis maximales (50 nM y 75 nM respectivamente). Es posible que en el caso de un estímulo complejo como el FCS, en el que están presentes grandes cantidades de factores bioactivos con potencial mitogénico, no haya lugar para un reforzamiento de la acción por el ácido oleico. Sin embargo, cuando se utilizan mitógenos que activan vías de señalización intracelular concretas y definidas, sí se observa claramente un efecto potenciador del ácido oleico sobre la respuesta mitogénica a estos estímulos, cuya potencia relativa, expresada en unidades equivalentes de FCS, aumenta en un 400% (ET-1, potencia equivalente a 1% vs. 4% FCS) o un 609% (VEGF, potencia equivalente a 0,64% vs. 3,91% FCS). Cuando los experimentos de

proliferación se realizaron en condiciones de hipoxia, aunque la proliferación celular se reduce de forma apreciable, se observa que, en estas condiciones, (i) la proliferación en respuesta a dosis crecientes de FCS es significativamente más elevada en presencia de ácido oleico y (ii) la potenciación del efecto mitogénico de la ET-1 y del VEGF pasan a ser, respectivamente, del 457% (potencia equivalente a 1,22% vs. 6,80% FCS) y del 944% (VEGF, potencia equivalente a 0,59% vs. 5,57% FCS).

Un posible mecanismo bioquímico que explicaría la potenciación que el ácido oleico ejerce sobre el efecto mitogénico de ET-1 y VEGF podría ocurrir a nivel de la PKC. En efecto, sabemos que los ácidos grasos *cis*-insaturados (pero no los saturados ni los *trans*-insaturados) activan directamente la PKC interaccionando con un dominio de unión diferente al del DAG (el Touny, Khan et al. 1990). Sabemos además que son activadores más potentes de las isoformas de PKC que no dependen de Ca^{2+} para su activación (Khan, Blobe et al. 1993). Dado que los receptores de ET-1 y VEGF activan también la vía de la PKC (Hirata, Emori et al. 1993; Takahashi, Ueno et al. 1999), es posible que un efecto sinérgico sobre la vía de la PKC contribuyese a explicar la potenciación que el ácido oleico ejerce sobre la proliferación celular inducida por ET-1 y VEGF.

Los efectos potenciadores sobre la proliferación celular que el ácido oleico ejerce en condiciones de hipoxia, tanto sobre estímulos complejos (FCS) como sobre estímulos que activan vías bioquímicas concretas (ET-1, VEGF), resultan especialmente interesantes si tenemos en cuenta que, en situaciones de hipoxia clínica, se produce una acumulación de ácidos grasos a nivel tisular (Hochachka 1986; Yoshida, Ikeda et al. 1986). Además, las células endoteliales, por su localización en la interfaz entre la sangre y los tejidos, son especialmente sensibles a la isquemia (Forman, Puett et al. 1989). Se ha demostrado que en condiciones de hipoxia se produce una respuesta inflamatoria caracterizada por una activación de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Por otra parte, el incremento de la adhesión de los PMN a células endoteliales cultivadas en condiciones de hipoxia está mediado por la expresión de ICAM-1 en la superficie de las células endoteliales y de glicoproteína CD11b/CD18 en la membrana de los PMN (Arnould, Michiels et al. 1993). El ácido oleico bloquea la adhesión de los PMN (Arnould, Michiels et al. 1993) a las células endoteliales ejerciendo un efecto protector frente al daño endotelial. Este efecto podría explicar la potenciación de la respuesta proliferativa a diferentes estímulos que hemos observado para el ácido oleico en los experimentos realizados en condiciones de hipoxia, máxime si tenemos en cuenta que, a excepción de un rápido período inicial en el cual aumenta la proliferación en células endoteliales (Schafer, Ewald et al. 2003), la hipoxia induce una reducción tiempo-dependiente de la proliferación celular (Ben-Yosef, Miller et al. 2005).

Las propiedades anti-apoptóticas observadas en este estudio para el ácido oleico, especialmente en condiciones de restricción de nutrientes, y su efecto potenciador sobre la mitosis en situaciones de hipoxia experimental, podrían así constituir nuevos mecanismos bioquímicos que contribuirían a explicar los efectos cardioprotectores de los ácidos grasos *cis*-monoinsaturados.

Numerosos estudios indican que los efectos de los ácidos grasos libres sobre la fisiología celular dependen de su conformación espacial, que puede ser angular (ácidos grasos *cis*-monoinsaturados, tipo A de Karnowsky) o predominantemente lineal (ácidos grasos saturados o *trans*-insaturados, tipo B de Karnowsky). Esta diferencia estructural determina importantes diferencias en su interacción con las bicapas lipídicas. Los ácidos grasos de tipo B, se intercalan sin provocar desorganización estructural importante en la región hidrofóbica de la bicapa. Por el contrario, los ácidos grasos de tipo A, causan alteraciones importantes en la misma, modificando la fluidez de la membrana y las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína (Karnowsky 1979; Klausner, Kleinfeld et al. 1980; Pjura, Kleinfeld et al. 1984). Así, se ha descrito que el ácido oleico (pero no el ácido esteárico ni el ácido eláidico) bloquea el aumento de $[\text{Ca}^{+2}]_i$, del potencial de membrana y la generación de IP_3 que se produce tras la activación del receptor de EGF, sin que se afecte la unión de EGF a su receptor, la oligomerización del receptor, la activación del dominio tirosín-quinasa del receptor ni la autofosforilación del

extremo C-terminal del receptor (Casabiell, Pandiella et al. 1991). Sabemos también que los ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (pero no los saturados ni los *trans*-insaturados) activan la PKC (el Touny, Khan et al. 1990) induciendo proliferación celular (Lu, Morinelli et al. 1996).

Teniendo en cuenta este hecho, en el presente estudio se han realizado experimentos para comprobar si los efectos anti-apoptóticos observados para el ácido oleico (18:1 *cis* Δ 9) en células MS-1 en condiciones de restricción de nutrientes, se mantenían cuando este ácido graso se substituía por cantidades equimoleculares del ácido graso C 18 saturado (ácido esteárico) o del C 18 *trans*-insaturado (ácido elaídico). Inicialmente se estudió el efecto de estos ácidos grasos tras 48 horas de cultivo. Nuestros resultados muestran que, al igual que en muchos otros sistemas biológicos, los efectos observados poseen una clara dependencia de la conformación espacial del ácido graso utilizado, no observándose diferencias estadísticamente significativas en la apoptosis con respecto a los controles, cuando las células cultivadas en medio completo se trataron con ácido esteárico o con ácido elaídico. En células serodeprivadas, el ácido elaídico provocó una disminución de la apoptosis de menor magnitud a la observada con ácido oleico, mientras que el ácido esteárico mostró una apoptosis similar a la observada en células control, aunque las diferencias fueron estadísticamente significativas a las 48 horas de cultivo. Vistos estos efectos, posteriormente se estudió el efecto sobre el ciclo celular de estos ácidos grasos a diferentes intervalos temporales.

El análisis de la progresión del ciclo celular en células tratadas con los ácidos grasos tipo B en condiciones estándar de crecimiento, indicó que éstos no inducen proliferación celular, a diferencia de lo observado en las células tratadas con ácido oleico, donde se apreció una aceleración en la entrada en la fase de S. Estos resultados concuerdan con datos previos que muestran que el ácido oleico (pero no los ácidos grasos saturados ni los *trans*-insaturados), activan la PKC, induciendo proliferación celular (el Touny, Khan et al. 1990; Lu, Morinelli et al. 1996). A su vez, existe una correlación positiva entre proliferación celular y grado de fluidez de membrana. Estudios anteriores indican que en células de sarcoma cultivadas en medio libre de suero y con albúmina delipidada suplementada con diversas cantidades de ácidos grasos saturados e insaturados (que en estas condiciones se supone que son incorporados a los fosfolípidos de membrana), los ácidos grasos insaturados incrementaron la fluidez de la membrana con un concomitante aumento de la proliferación, mientras que la suplementación con ácidos grasos saturados no tuvo el mismo efecto. La proliferación celular está acompañada por un incremento en la fluidez de la membrana en las fases M y S en células de hepatoma, 3T3, fibroblastos y hepatocitos proliferantes. Esto indica que la proliferación celular está asociada a un incremento en la fluidez de la membrana plasmática en las fases del ciclo celular asociadas con el crecimiento (M, S) (Aloia 2013).

En células MS-1, en condiciones de serodeprivación, el número de células que entran en fase S en los cultivos control se mantiene constante hasta las 24 horas, mientras que posteriormente se observó una disminución de esta población hasta las 48 h, lo cual es esperable debido a la falta de factores de crecimiento aportados por el suero. Hay que tener en cuenta que al tratarse de una línea transformada, las células poseen una cierta capacidad para mantener la división celular de forma constitutiva y no sincronizada. El tratamiento con los ácidos grasos tipo A y B, mostró efectos distintos. En el caso del ácido oleico se produce un incremento de la población celular en fase S hasta las 24 h, después disminuye ligeramente. Por otra parte, con los ácidos grasos tipo B se produce un aumento del número de células en fase S hasta las 18 h (mayor para el caso del ácido elaídico), para posteriormente disminuir progresivamente con el tiempo de cultivo, siendo mayor la disminución para el ácido esteárico que para el elaídico. Esto indica que el ácido elaídico presenta un comportamiento intermedio entre el ácido oleico y el ácido esteárico. Estos efectos sobre la proliferación se observan claramente cuando se realiza un análisis total de la población celular en fase S durante las 48 horas de cultivo (Figura 34). El ácido oleico aumentó el número de células en fase S, mientras que el elaídico no tuvo efecto alguno a este respecto y el esteárico mostró un efecto inverso al oleico. En este sentido, estudios en células endoteliales de aorta humanas (HAEC), demostraron que el tratamiento con bajas concentraciones de ácido esteárico (<50 μ M) inhibe el crecimiento celular (Harvey, Walker et al. 2010), mientras que el tratamiento de estas células

con ácido elaídico afecta mínimamente al crecimiento celular (Harvey, Walker et al. 2012). Esto está de acuerdo con una relación directa entre un aumento de fluidez y la proliferación celular.

Al igual que la exposición de células MS-1 cultivadas en medio completo a ácido oleico, el tratamiento con ácidos grasos tipo B no afectó a la viabilidad celular a las dosis utilizadas. Sin embargo, en condiciones de restricción de nutrientes, el número de células en fase S se mantuvo estable en los controles desde $t=6$ h, hasta $t=24$ h, para disminuir posteriormente con el tiempo de cultivo (siendo esta disminución más acusada en células tratadas con ácido elaídico y esteárico). La población celular en fase G2/M, se mantiene más o menos constante durante todo el experimento, mientras que el porcentaje de células en fase G0/G1 se redujo de forma clara con el tiempo. El discreto nivel de reclutamiento a la fase S no fue suficiente para explicar la progresiva reducción en la fase G0/G1. Sin embargo, al cuantificarse la población subdiploide (contenido de DNA $< 2n$), se observó que se produjo un aumento muy marcado de la apoptosis, lo que explicaría la fuerte reducción de la población en fase G0/G1. El tratamiento con ácido esteárico, provocó una caída de la fase G2/M y de la fase G0/G1 con el tiempo de cultivo, con un aumento concomitante del porcentaje de células que sufrieron apoptosis celular. Esto indica que en este caso, las células que sufrieron apoptosis provinieron de células cuyo ciclo celular estaba detenido en G2/M y en G0/G1. A las 42 h de cultivo (tiempo al que se obtiene el máximo porcentaje de apoptosis con el tratamiento control), se observó un 21,82% de aumento de la apoptosis frente al control. El ácido elaídico, al igual que sucedió en el análisis de su efecto sobre la proliferación celular, tuvo un comportamiento intermedio entre el del ácido oleico y el del ácido esteárico. Se observó una disminución del número de células en fase G0/G1 de menor magnitud que en células no tratadas, hasta las 36-42 h, tiempo al cual se obtuvo el mayor porcentaje de apoptosis. A las 42 h de cultivo se obtuvo una disminución de la apoptosis celular del 39,36%. Sin embargo, como se indicó previamente, en células tratadas con ácido oleico la disminución de la apoptosis fue mucho mayor, observándose una disminución del 64,84% con respecto a los cultivos control.

El ácido oleico en células MS-1 ejerció un efecto claramente anti-apoptótico, mientras que el ácido elaídico, aunque disminuyó la apoptosis, tuvo un efecto más discreto. Contrariamente, el ácido esteárico aumentó la apoptosis observada en células MS-1 serodeprivadas.

La elevación de ácidos grasos libres en suero desempeña un importante papel en la aterosclerosis (Armstrong, Hiremagalur et al. 2005; Pilz, Schrnagl et al. 2006). En determinadas situaciones patológicas, las concentraciones de ácidos grasos libres en plasma pueden alcanzar el rango milimolar y las células endoteliales en particular, podrían estar expuestas a concentraciones excesivamente altas de ácidos grasos, debido a la lipólisis local de los triglicéridos de las lipoproteínas por la lipoproteinlipasa endotelial (Reaven, Hollenbeck et al. 1988; Fagot-Campagna, Balkau et al. 1998). La re-endotelización se produce a través de células progenitoras endoteliales de la médula ósea (EPC) (Asahara, Murohara et al. 1997). De esta forma, la pérdida de integridad endotelial debida a la apoptosis desencadenada por los factores de riesgo ateroscleróticos, va a ser reparada por las EPC. *In vitro*, las altas concentraciones de ácidos grasos contribuyen a la apoptosis acelerada del endotelio. En la aterosclerosis, además de contribuir a la formación de la lesión inicial debido al desprendimiento de las células endoteliales de la capa íntima subyacente, la apoptosis endotelial conduce a un aumento de permeabilidad vascular, a la erosión de la placa y a la ruptura de la placa (Choy, Granville et al. 2001; Rossig, Dimmeler et al. 2001). Los resultados observados en este estudio sobre la apoptosis endotelial, podrían explicar en parte los diferentes efectos que se les atribuyen a los ácidos grasos *cis*-insaturados, saturados y *trans*-insaturados a nivel del sistema cardiovascular. Incluso, algunos trabajos previos demuestran que el ácido oleico bloquea los efectos citotóxicos de los ácidos grasos saturados de cadena larga sobre el endotelio vascular, inhibiendo la activación y apoptosis endotelial.

El ácido esteárico en células MS-1 inhibió la proliferación y aumentó la apoptosis observada en condiciones de serodeprivación. En otros tipos celulares se ha demostrado que presenta efectos citotóxicos similares. En células de la granulosa humanas, disminuye marcadamente la supervivencia de manera dosis-dependiente por una inducción de la apoptosis (Mu, Yanase et

al. 2001). En células endoteliales también inhibió el crecimiento celular, indujo apoptosis e incrementó significativamente la expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), siendo la respuesta pro-inflamatoria confirmada por la fosforilación de I κ B- α y del NF- κ B de manera dosis-dependiente (Harvey, Walker et al. 2010a). En células HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) y en células de tejidos susceptibles a complicaciones vasculares diabéticas tardías: células endoteliales aórticas humanas (HAEC), células endoteliales humanas de la retina (HREC), así como en EPC humanas implicadas en la reparación vascular (Artwohl, Lindenmair et al. 2008), se demostró que la apoptosis inducida por los ácidos grasos, depende del origen vascular de las células endoteliales, del estado de proliferación celular y de la estructura de los ácidos grasos. El ácido oleico, independientemente del estado proliferativo, no provocó muerte en ningún tipo celular. La apoptosis inducida por ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) está mediada por la caspasa 8 y depende del origen vascular (en HREC no desencadenaron apoptosis) y del estado proliferativo de las células, siendo éstas resistentes a la apoptosis en estado de quiescencia. El ácido esteárico produce apoptosis de forma dosis-dependiente en todos los tipos celulares con independencia del estado proliferativo, por un mecanismo totalmente diferente al de los PUFA. En este caso la actividad pro-apoptótica está relacionada con el aumento de rigidez provocado en las membranas de las células. Esta apoptosis inducida por el ácido esteárico, se supone que podría estar mediada por una disminución de la fluidez de membrana, debido a que tanto la rigidez de la membrana como la apoptosis son contrarrestadas por el ácido eicosapentaenoico (EPA). El EPA es un ácido graso altamente insaturado Δ 3, que se sabe que aumenta la fluidez de la membrana en varios tipos celulares, incluyendo células endoteliales (Hashimoto, Hossain et al. 1999). Además, a bajas concentraciones, inhibe la apoptosis inducida por el desprendimiento de las células endoteliales. En estos tipos celulares inhibió la apoptosis y disminuyó la rigidez de la membrana inducida por el ácido esteárico. Existen estudios previos que han demostrado que una reducción de la fluidez de la membrana se acompaña de un aumento de apoptosis (Tebbey and Buttke 1990; Bhosle, Huilgol et al. 2005). En células T expuestas a ácido esteárico, el aumento de la rigidez de la membrana celular desencadenó apoptosis (Tebbey and Buttke 1990). Como se mencionó anteriormente, y al igual que en este trabajo, el ácido oleico no provocó muerte en ningún tipo celular mientras que aumentó la fluidez de las membranas en algunos tipos celulares como linfocitos, células de riñón de hámster, fibroblastos (células 3T3) y membranas de monocitos (Klausner, Kleinfeld et al. 1980; Kuo, Weinfeld et al. 1990). Sin embargo, se demostró que el ácido esteárico aumenta la rigidez de las membranas y al mismo tiempo induce apoptosis, la cual es inhibida por el EPA al incrementar la fluidez de la membrana en las células endoteliales estudiadas, suponiéndose una relación inversa entre el grado de fluidez de la membrana y la apoptosis celular. En este sentido, en ensayos posteriores estudiamos el efecto del ácido oleico, eláidico y esteárico sobre la fluidez de membrana en nuestro modelo celular.

La inducción de apoptosis en HREC y HAEC desencadenada por el ácido esteárico y por los PUFAs podría contribuir al desarrollo de enfermedades micro y macrovasculares, incluyendo la aterosclerosis prematura. El ácido oleico, al igual que en nuestro modelo celular, no desencadenó apoptosis endotelial, lo cual concuerda con las observaciones de que los ácidos grasos monoinsaturados presentes en el aceite de oliva y en la dieta mediterránea atenúan el desarrollo de aterosclerosis (Massaro and De Caterina 2002), mientras que la ingesta de altas cantidades de ácido esteárico y de PUFA aparentemente contribuyen a la disfunción endotelial y a la aterosclerosis prematura (Yam, Eliraz et al. 1996; Hennig, Toborek et al. 2001). Nuestros resultados, al igual que los mencionados anteriormente, están en consonancia con las recomendaciones dietéticas que indican que la dieta "ideal" en la prevención de la aterosclerosis se basa en la reducción del contenido total de ácidos grasos saturados y poliinsaturados de la dieta, y su sustitución por ácidos grasos de tipo monoinsaturado, fundamentalmente ácido oleico (Garrido and Mata 1994).

En este sentido, el ácido oleico en células MS-1 serodeprivadas, presentó un claro efecto citoprotector al inhibir la apoptosis inducida por la serodeprivación. Este efecto puede ser consecuencia de su incorporación en la bicapa lipídica, donde podría alterar las cascadas de

señalización que inducen apoptosis. Se sabe que este ácido graso inhibe el aumento de Ca^{+2} intracelular (Casabiell, Pandiella et al. 1991; Perez, Casabiell et al. 1997; Perez, Camina et al. 1997a; Perez, Camina et al. 1998). El aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular, podría conducir a la activación de quinasas dependientes de Ca^{+2} o fosfatasa, con la consiguiente activación de genes relacionados con la apoptosis. El incremento de los niveles de Ca^{+2} intracelular, también provoca un aumento de la captación de Ca^{+2} por la mitocondria, por lo que aumenta la liberación de citocromo C y la activación de la vía de la apoptosis mitocondrial (Szabadkai and Rizzuto 2004). Este efecto protector también se observó en células HAEC tratadas con ácido esteárico, donde este último a bajas concentraciones inhibe el crecimiento, mientras que a dosis altas induce muerte celular de manera dosis-dependiente. Estos efectos son bloqueados por el tratamiento con ácido oleico. A bajas concentraciones, el ácido oleico disminuye los efectos citotóxicos, inhibe la apoptosis, inhibe el aumento de la expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la fosforilación del NF- κ B (regulador transcripcional de ICAM-1) inducida por ácido esteárico. A dosis más altas, bloquea por completo los efectos citotóxicos, la apoptosis y la activación de la caspasa 3 producida por el ácido esteárico. Globalmente, nuestros datos junto con los previamente citados, indican que el ácido oleico ejerce un efecto citoprotector, ya que inhibe los efectos tóxicos que el ácido esteárico induce en diversos tipos celulares y en nuestro estudio protege frente a la apoptosis inducida por la serodeprivación. El estudio del perfil lipídico de las células suplementadas con ácido oleico o ácido esteárico a nivel de los fosfolípidos de membrana, mostró que la suplementación con cualquiera de estos ácidos grasos aumentó significativamente su respectivo contenido en los fosfolípidos de membrana. Además, la combinación de los dos ácidos grasos, presentó un patrón intermedio entre la suplementación con ácido esteárico y con ácido oleico (Harvey, Walker et al. 2010). Estos resultados sugieren que: a) un exceso de ácido esteárico se acumula en los fosfolípidos, creando así una estructura extremadamente rígida lo que resulta en lipotoxicidad, b) el ácido oleico neutraliza el impacto negativo de los ácidos grasos saturados sobre las funciones de las células endoteliales, mediante el desplazamiento del ácido esteárico de la bicapa lipídica. De esta forma, evita la activación de las cascadas de señalización inducidas por el ácido esteárico que promueven la inflamación y/o inducen la apoptosis, efectos que son posiblemente consecuencia de un aumento de la rigidez de membrana provocada por el ácido esteárico.

Como se mencionó anteriormente, la suplementación de células MS-1 serodeprivadas con ácido elaídico produjo un efecto intermedio entre el observado con ácido oleico y con ácido esteárico. Observaciones similares se obtuvieron en otros trabajos donde el tratamiento de células HAEC con ácido elaídico a bajas concentraciones, fue bien tolerado en términos de crecimiento endotelial, no afectando al crecimiento (a diferencia del ácido esteárico). En relación al efecto pro-inflamatorio, a diferencia del ácido oleico, el ácido elaídico también indujo una respuesta pro-inflamatoria similar al ácido esteárico aumentando la fosforilación del regulador transcripcional de ICAM-1; NF- κ B y aumentó en la superficie de las células endoteliales la expresión de ICAM-1. A nivel de la apoptosis celular, modificó ligeramente el porcentaje de células que sufrieron apoptosis. Al igual que en nuestro estudio, el ácido elaídico mostró un comportamiento intermedio entre el ácido oleico y el ácido esteárico. Sin embargo, estos resultados difieren con otros donde el ácido elaídico induce apoptosis celular en células HUVEC de manera dosis-dependiente a través de la producción intracelular de ROS y de la activación de las caspasas 3, 8 y 9 (Qiu, Hu et al. 2012) (Zapolska-Downar, Kosmider et al. 2005). Estas diferencias pueden deberse a una distinta sensibilidad de estos tipos celulares a ácidos grasos *trans*-insaturados, lo cual es importante tener en cuenta a la hora de estudiar el efecto de este tipo de ácidos grasos sobre el endotelio vascular. También hay que tener en cuenta la diferente concentración utilizada, ya que estos estudios usaron concentraciones excesivamente altas (hasta 5 mM), mientras que en nuestro caso usamos 10 μ M, con lo cual es difícil comparar nuestros resultados con los obtenidos en células HUVEC.

Para el ácido elaídico, también se observó un efecto entre el ácido esteárico y el ácido oleico en cardiomiocitos neonatales de rata cultivados en condiciones de serodeprivación, en los que el ácido esteárico provocó una inducción de la apoptosis celular, mientras que el

tratamiento con ácido oleico ó con ácido elaídico no desencadenaron apoptosis. Además, la administración de cantidades equimoleculares de ácido oleico a células tratadas con ácido esteárico, contrarrestó el efecto tóxico del ácido esteárico, mientras que el tratamiento con ácido elaídico retrasó la apoptosis pero no la previno (de Vries, Vork et al. 1997). Estos efectos pueden ser debidos a que una vez suministrados a las células, los ácidos grasos son rápidamente incorporados en los fosfolípidos de la membrana celular afectando a la fluidez de membrana. El aumento de la cantidad de ácido esteárico (punto de fusión elevado) en los fosfolípidos, disminuye la fluidez de la membrana (Stubbs and Smith 1984) y por consiguiente eleva la temperatura de transición de fase de la membrana. A temperaturas por debajo de la temperatura de transición, los fosfolípidos de la membrana se encuentran en fase de transición gel-líquido cristalina, alterándose severamente las funciones de la membrana (Innis and Clandinin 1981; Stubbs and Smith 1984). En este sentido, se demostró una menor viabilidad celular con la exposición a ácido esteárico, pero no cuando las células se expusieron a ácido oleico. Aparentemente, con el ácido elaídico se obtiene un efecto intermedio; cuando se suministró a los cardiomiocitos, no se afectó la supervivencia celular. Sin embargo, administrado en combinación con ácido esteárico la muerte celular no se inhibió, aunque se retrasó en el tiempo. Estos efectos, al igual que los observados tras la exposición de las células MS-1 a los ácidos grasos estudiados, pueden ser explicados por la diferente alteración en la fluidez de membrana que van a provocar los distintos ácidos grasos al incorporarse en los fosfolípidos de membrana. El ácido elaídico provocaría una fluidez intermedia entre la inducida por el ácido oleico y la inducida por el ácido esteárico, ya que su incorporación en la membrana plasmática se produce a expensas de los ácidos grasos saturados (Harvey, Walker et al. 2010), lo que explicaría nuestras observaciones. Existen evidencias de que el incremento del porcentaje de ácidos grasos saturados en los fosfolípidos de la membrana y por lo tanto de la rigidez, forma una parte esencial del proceso de apoptosis (Singh, Dasgupta et al. 1996). Además, alteraciones en la composición de los fosfolípidos de la membrana podrían actuar como desencadenantes de este proceso de muerte celular (Cui, Houweling et al. 1996; Surette, Winkler et al. 1996). Por ejemplo, el defecto genético en la síntesis de fosfatidilcolina, desencadena apoptosis en células de ovario de hámster (CHO) (Cui, Houweling et al. 1996). Se demostró también que la inhibición farmacológica de la redistribución de araquidonato, entre varias clases de fosfolípidos, induce apoptosis en una línea celular promielocítica (Surette, Winkler et al. 1996).

Basándonos en nuestras observaciones y en los estudios previos mencionados, postulamos que la alteración de la fluidez de membrana provocada por los diferentes ácidos grasos podría estar implicada en la regulación de la proliferación y apoptosis en células MS-1. Por ello, en una segunda fase se estudiaron los efectos del ácido oleico, elaídico y esteárico sobre la fluidez de membrana en este modelo celular.

5.2-Estudio del efecto del ácido oleico, elaídico y esteárico sobre la fluidez de membrana en células MS-1

Los ácidos grasos pueden encontrarse en las bicapas en forma ordenada y rígida o bien en forma relativamente desordenada, es decir, en estado fluido. El estado rígido viene favorecido por la presencia de ácidos grasos saturados, ya que sus cadenas hidrocarbonadas rectas se empaquetan muy estrechamente estableciéndose interacciones de Van der Waals a lo largo de las mismas. Por otro lado, un doble enlace *cis* produce un acodamiento en la cadena hidrocarbonada (la cadena presenta dos tramos rectilíneos, separados por el doble enlace, que forman entre sí un ángulo de unos 120°). Este acodamiento impide que sus moléculas se empaqueten tan estrechamente dificultando la formación de interacciones de Van der Waals. Así, al existir entre las cadenas hidrocarbonadas un menor número de interacciones, la energía térmica necesaria para romperlas es menor, lo que se traduce en un menor punto de fusión. Los dobles enlaces *trans*, apenas determinan una ligera sinuosidad en la cadena sin que ello suponga un cambio significativo en la orientación de la misma, presentando conformaciones espaciales muy similares a las de los ácidos grasos saturados. Estas diferencias en cuanto a la

conformación espacial de los distintos tipos de ácidos grasos influyen considerablemente en sus propiedades físicas y tienen notables implicaciones biológicas. La fluidez depende del tipo de insaturación de la cadena hidrocarbonada y de la longitud de la cadena de los ácidos grasos, ya que las cadenas hidrocarbonadas largas interaccionan mutuamente más fuertemente que las cortas. Los ácidos oleico, elaídico y esteárico presentan la misma longitud de cadena (18 átomos de carbono), por lo que sus efectos sobre la fluidez van a depender del tipo de insaturación. Los ácidos grasos saturados tienen puntos de fusión significativamente mayores que los insaturados de igual número de átomos de carbono. Por lo tanto, la diferente conformación de la cadena hidrocarbonada va a determinar los distintos puntos de fusión de los ácidos esteárico, elaídico y oleico (Alberts, Johnson et al. 2002; Lehninger 2009). El ácido esteárico (saturado) presenta un punto de fusión de 69,6 °C; el ácido elaídico (*trans*- insaturado) de 46,5 °C y el ácido oleico (*cis*-insaturado) de 15,0 °C (Roach, Feller et al. 2004).

Como se mencionó anteriormente, en la segunda fase de este trabajo se estudió el efecto de los ácidos grasos libres tipo A (ácido oleico) y tipo B (ácido elaídico, esteárico) a concentraciones crecientes 5, 10, 15, 20, 25, 50 y 100 µM sobre la fluidez de membrana en células endoteliales MS-1 tal como se indicó en el apartado de materiales y métodos. El tratamiento de células MS-1 con ácido oleico, provocó una disminución de la emisión de luz polarizada por parte de la sonda (DPH), lo que se traduce en un aumento de la fluidez, siendo este aumento proporcional a la concentración de ácido oleico. El mismo efecto se observó en el caso del ácido elaídico, aunque la magnitud del mismo fue aproximadamente la mitad del observado con el ácido oleico. Sin embargo la adición de ácido esteárico a las membranas de células endoteliales MS-1 no afectó a su fluidez a concentraciones de 5 a 50 µM, mientras que a concentración de 100 µM provocó un ligero aumento de la rigidez de las membranas de las células endoteliales. Las diferencias observadas en la fluidez se correlacionan con los puntos de fusión de los ácidos grasos estudiados: a menor el punto de fusión del ácido graso, mayor fue la fluidez (ácido oleico > ácido elaídico > ácido esteárico). Esto parece estar relacionado con la estructura de los mismos. Como se menciona arriba, el ácido oleico posee una estructura angular, de forma que al incorporarse en la bicapa interfiere en las interacciones hidrofóbicas de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de membrana, mientras que el ácido elaídico al presentar una estructura lineal debido al doble enlace *trans*, afecta en menor medida a dichas interacciones. Por último el ácido esteárico al ser un ácido graso saturado, no provoca alteraciones importantes en la estructura de la membrana en nuestro modelo con células MS-1.

Aunque algunos estudios indican que los ácidos grasos *trans*-insaturados pueden afectar a las membranas celulares de forma más similar a los ácidos grasos saturados que a los *cis*-insaturados, existe controversia al respecto. Engelhard et al. encontraron que la adición de ácidos grasos *trans* al medio de cultivo incrementó la fluidez de membrana de fibroblastos de ratón (Engelhard, Esko et al. 1976), datos que concuerdan con lo observado en este trabajo.

Se sabe que los ácidos grasos libres alteran una gran variedad de funciones celulares (Karnovsky 1979). Esto se cree es debido a que tras su incorporación en la membrana inducen una perturbación de la estructura de la bicapa, modificando sus características de fluidez. Los ácidos grasos libres se intercalan fácilmente en la membrana y durante cortos períodos de tiempo permanecen como ácidos grasos no esterificados. Al intercalarse producen cambios significativos en el ensamblaje de las moléculas de lípidos. Los ácidos grasos *cis*-insaturados desordenan el interior de la membrana, mientras que los ácidos grasos saturados y *trans*-insaturados no alteran el interior de la bicapa (Klausner, Kleinfeld et al. 1980). Estas interacciones resultan en significantes perturbaciones. En este trabajo se muestra que el ácido oleico aumenta la fluidez de las membranas de células endoteliales MS-1. Trabajos previos han demostrado que este ácido graso tiene un efecto similar en vesículas lipídicas, vesículas lipídicas mixtas, membranas aisladas de linfocitos, linfocitos, células de riñón de hámster y en fibroblastos (células 3T3) (Klausner, Kleinfeld et al. 1980). Es importante señalar que en este último trabajo se utilizó la misma metodología de determinación de la variación de la fluidez de las membranas que el utilizado para la realización de la presente Tesis Doctoral. Una diferencia importante con respecto a nuestros resultados es que no se observó efecto alguno sobre la fluidez de las membranas y de vesículas lipídicas mixtas cuando se expusieron a ácidos grasos

tipo B (saturados y *trans*-insaturados). Sin embargo, tanto los ácidos grasos tipo A como los de tipo B disminuyeron la polarización en vesículas lipídicas. En nuestro caso, el ácido oleico (tipo A) y el ácido eláidico (tipo B) aumentan la fluidez de la membrana, mientras que el ácido esteárico (tipo B) la reduce ligeramente a concentraciones elevadas. Esto indica que, en lo que respecta al efecto de ácidos grasos sobre la fluidez de la membrana plasmática, distintos tipos celulares responden de manera diferente, lo que puede ser debido a diferencias en la composición de la membrana ya que los ácidos grasos tipo A se van a incorporar a los dominios de membrana más fluidos, mientras que los ácidos grasos tipo B se sitúan en las regiones más ordenadas de membrana provocando alteraciones mínimas en las cadenas hidrocarbonadas.

Además de los efectos observados *in vitro*, otros autores han demostrado que, *in vivo*, los ácidos grasos *cis* de la dieta son incorporados en las membranas celulares y pueden alterar sus propiedades físicas. El incremento de la concentración de ácidos grasos *cis* en la composición de la membrana aumenta su fluidez, mientras que el incremento en la composición de ácidos *trans*-insaturados y saturados la disminuye (Kuo, Weinfeld et al. 1990). Estos cambios en las propiedades físicas de la membrana se han asociado con alteraciones en funciones celulares dependientes de ésta como por ejemplo el capping de receptores en los linfocitos (Hoover, Bhalla et al. 1980), la agregación plaquetaria (MacIntyre, Hoover et al. 1984) y la eritrofagocitosis por macrófagos (Lokesh and Wrann 1984). En células hepáticas los ácidos grasos afectan la unión de ligandos a receptores β -adrenérgicos, serotoninérgicos y opiáceos (North and Fleischer 1983) por alteraciones en el contenido lipídico y de la fluidez de la membrana. En células CHO el ácido oleico, al alterar la estructura de la membrana y hacerla más fluida, suprime la desensibilización del receptor de ghrelina bloqueando su internalización sin afectar a la afinidad del receptor por su ligando, con lo cual se van a potenciar los efectos de esta hormona; a nivel cardiovascular induce disminución de la presión arterial, vasodilatación y mejora de la función endotelial (Delhanty, van Kerkwijk et al. 2010). En su conjunto, estos datos indican que las alteraciones que los ácidos grasos *cis* producen en la fluidez de las membranas van a afectar a aquellos procesos celulares que tienen lugar a este nivel, tales como el transporte mediado por proteínas, la actividad de las enzimas ligadas a la membrana, la fagocitosis, la endocitosis, la exocitosis y los fenómenos relacionados con la citotoxicidad, el crecimiento y la diferenciación celular (Spector and Yorek 1985). En este contexto, los ácidos grasos de la dieta tienen diferentes efectos en el metabolismo de las LDL; los ácidos *cis*-insaturados disminuyen los niveles de LDL, mientras que los ácidos grasos *trans*-insaturados y saturados los aumentan. Estos diferentes efectos podrían ser explicados por las modificaciones que estos ácidos grasos producen en la fluidez. El receptor de LDL es el principal responsable del aclaramiento celular de LDL. Una deficiencia o disfunción de este receptor conduce a una elevación de los niveles de LDL circulantes y por consiguiente se promueve la aterogénesis. Gran número de pasos en el procesamiento de la unión de LDL al receptor pueden ser anómalos: puede estar disminuida la afinidad de LDL por el receptor, el reclutamiento del receptor, pueden producirse alteraciones en la formación del endosoma y disminución de su degradación lisosomal (Tolleshaug, Hobgood et al. 1983; Goldstein, Brown et al. 1985; Lehrman, Goldstein et al. 1985; Zannis and Breslow 1985; Hobbs, Brown et al. 1986). Todos estos procesos ocurren dentro del ambiente de la membrana, y por lo tanto pueden ser afectados por la composición lipídica y por sus propiedades físico-químicas. En estudios realizados con monocitos (U937), el enriquecimiento de la membrana plasmática con ácido oleico aumentó su fluidez, lo cual conllevó un aumento en la unión, captación y degradación de LDL. Contrariamente, el enriquecimiento de la membrana plasmática con ácido esteárico provocó una disminución de la fluidez y un descenso en la unión y captación de LDL. Este estudio demostró que la modificación de la membrana plasmática provocada por la incorporación de ácidos grasos puede alterar drásticamente la función del receptor LDL. Así, los ácidos grasos *cis*-insaturados al incorporarse en la membrana plasmática de monocitos (U937), aumentan considerablemente la unión, captación y degradación de LDL. Este puede ser un posible mecanismo por el cual dietas ricas en ácidos grasos *cis*-insaturados producen un aumento del aclaramiento hepático de LDL (Kuo, Weinfeld et al. 1990). Los datos

presentados en este trabajo, reafirman la hipótesis de que los efectos de los ácidos grasos sobre la fluidez de la membrana plasmática son fuertemente dependientes de su estructura y grado de insaturación, pudiendo afectar aquellos procesos celulares que tienen lugar en el plano de la membrana.

Como se mencionó previamente, la composición lipídica de las membranas regula sus propiedades físico-químicas: estructura, fluidez, viscosidad, permeabilidad, formación de microdominios, tensión de cizallamiento, etc (Hampton, Floyd et al. 1980; Gudi, Nolan et al. 1998). Las propiedades de los lípidos de membrana modulan las funciones de las proteínas integrales y asociadas a ésta, como su actividad enzimática, las interacciones proteína-membrana, la unión a receptores, la conductancia de canales iónicos, la generación de segundos mensajeros y, en última instancia, la expresión genética (Escriba, Sastre et al. 1995; Giorgione, Epand et al. 1995; Bogdanov, Sun et al. 1996; de Kruijff 1997; Escriba, Ozaita et al. 1997) (Khan, Blobe et al. 1992; Sumida, Graber et al. 1993; Escriba, Ozaita et al. 1997; Litman, Niu et al. 2001; Ntambi and Bene 2001). En este contexto, los ácidos grasos son los componentes mayoritarios de las membranas, principalmente unidos a fosfolípidos y a ésteres de colesterol, aunque también se pueden encontrar pequeñas cantidades de ácidos grasos libres (su concentración es generalmente baja, alrededor del 1% de los lípidos totales) (Engelbrecht, Louw et al. 1998). La composición de la grasa de la dieta puede afectar a la composición de ácidos grasos de las membranas. De hecho, dietas ricas en ácido oleico, como la dieta mediterránea, están asociadas con un incremento en los niveles de este ácido graso en las membranas plasmáticas de células humanas (Pagnan, Corrocher et al. 1989; Escudero, Montilla et al. 1998; Vicario, Malkova et al. 1998). La variación de los niveles de ácido oleico en las membranas celulares, está acompañada de modulaciones en la función de varias proteínas (Pagnan, Corrocher et al. 1989; Vicario, Malkova et al. 1998). Los mecanismos moleculares involucrados en la modulación de la estructura de las membranas y su función por parte de los ácidos grasos no están del todo claros (Perez, Pineiro et al. 2003). La fosfatidiletanolamina es el fosfolípido mayoritario presente en la cara interna de las membranas plasmáticas de mamíferos (Bogdanov, Sun et al. 1996). Se organiza mayoritariamente en estructuras lamelares que definen la célula, constituyendo un límite físico y dándole soporte a las proteínas de membrana. Sin embargo, este fosfolípido también es propenso a formar estructuras no lamelares como la fase hexagonal HII invertida (Cullis and de Kruijff 1979; Borovyagin and Sabelnikov 1989; Seddon 1990; Turner and Gruner 1992; Epand 1998). Bajo determinadas circunstancias, la composición lipídica de la membrana se puede modular para equilibrar el contenido de lípidos que facilitan la formación de la fase lamelar (pro-lamelares) y de la fase no lamelar (pro-nolamelares) (Giorgione, Epand et al. 1995; Rietveld, Koorengevel et al. 1995; Escriba, Ozaita et al. 1997; Gudi, Nolan et al. 1998). Por lo tanto, los cambios en la composición lipídica pueden reproducir un ajuste de la membrana a fin de regular las propiedades estructurales y preservar sus funciones (Giorgione, Epand et al. 1995; Rietveld, Koorengevel et al. 1995). Numerosos estudios han demostrado que las estructuras lipídicas no lamelares ejercen funciones definidas en las membranas (Siegel 1986; Lindblom and Rilfors 1990; de Kruijff 1997). Algunos de los roles atribuidos a los fosfolípidos con tendencia a formar estructuras HII incluyen la facilitación de la fusión o fisión de las bicapas (Siegel, Banschbach et al. 1989; Emoto, Kobayashi et al. 1996), la modulación de la permeabilidad y elasticidad de la membrana (Gudi, Nolan et al. 1998), el transporte de proteínas (Rietveld, Koorengevel et al. 1995), la regulación de la localización y de la actividad de las proteínas G y de la proteína-quinasa C (PKC) (Escriba, Sastre et al. 1995; Giorgione, Epand et al. 1995; Escriba, Ozaita et al. 1997), que son elementos clave en la señalización celular y controlan importantes funciones fisiológicas como la presión arterial (Escriba, Sanchez-Dominguez et al. 2003). El estudio de los efectos del ácido oleico y de otros ácidos grasos C18 (ácido eláidico y ácido esteárico) sobre el mesomorfismo de las membranas, demostró que el ácido oleico modula de manera dosis-dependiente la estructura de la membrana ejerciendo una presión lateral sobre los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina, lo que induce una tensión de curvatura negativa (facilitando la transición a la fase HII) sobre los lípidos de la fosfatidiletanolamina, mientras que el ácido eláidico y el ácido esteárico no alteran de forma importante la bicapa lipídica. En consecuencia, los efectos del ácido oleico (18:1 *cis* Δ 9) sobre el mesomorfismo lipídico son muy

probablemente debidos a su estructura ya que tiene una forma molecular similar a la de un boomerang, mientras que la forma del ácido eláidico (18:1 *trans* Δ 9) y del ácido esteárico (18:0) se asemejan a una varilla. Esta es la principal diferencia estructural entre el ácido oleico, eláidico y esteárico. De hecho, las composiciones químicas del ácido oleico y del ácido eláidico son idénticas ($C_{18}O_2H_{34}$), mientras que el ácido esteárico ($C_{18}O_2H_{36}$) tiene solamente dos hidrógenos más a causa de la ausencia del doble enlace. El efecto del ácido oleico no se puede atribuir simplemente a la presencia del doble enlace, ya que el ácido eláidico no ejerce efectos similares sobre la estructura de la fosfatidiletanolamina. Por otra parte, el ácido eláidico y el ácido esteárico, que difieren en su composición química, pero están más cerca en términos de forma molecular presentaron efectos similares (modestos) sobre la estructura de la membrana. Esta hipótesis basada en la conformación molecular del ácido oleico, explica su capacidad para facilitar la formación de fases no lamelares (Funari, Barcelo et al. 2003).

Se sabe que la propensión a la formación de la fase hexagonal (HII) de las membranas influye en la unión de las proteínas $G\alpha$, $G\beta\gamma$, y $G\alpha\beta\gamma$, lo que indica que la composición y la estructura de la membrana pueden regular la señalización celular (Vogler, Casas et al. 2004). Las proteínas G heterotriméricas ($G\alpha\beta\gamma$, preactiva) son reclutadas hacia los dominios de membrana ricos en proteínas receptoras, que exhiben una alta propensión a la formación de la fase no lamelar. Tras la activación por agonistas, el receptor activa la proteína G. Una vez activada la proteína G, la subunidad $G\alpha$ activa se disocia del complejo $G\beta\gamma$ y, debido a su menor afinidad por estructuras no lamelares y mayor afinidad por fases lamelares, puede ser reclutada a dominios con estructura de bicapa ordenada (por ejemplo, balsas de lípidos) (Vogler, Casas et al. 2004), donde puede activar la señalización de efectores abundantes en estos dominios. Por lo tanto, la modulación de la estructura de los lípidos (fase lamelar, no lamelar o propensión a formarlas) regula las interacciones y la movilización de proteínas G de la membrana a diferentes dominios de ésta después de la activación. Lo mismo sucede con la PKC, que ve facilitada su unión a la membrana y posterior activación cuando aumenta la propensión a la formación de la fase hexagonal HII (Escriba, Sastre et al. 1995). El tipo y la abundancia de especies de lípidos de membrana están regulados por la ingesta de grasas en la dieta, que de este modo influye en las propiedades de la membrana (Escudero, Montilla et al. 1998). Debido a la mayor propensión a formar fase no lamelar HII inducida por el ácido oleico, éste modula positivamente tanto a proteínas G como a PKC, mientras que tanto el ácido eláidico como el esteárico tienen un efecto contrario (Escriba, Sastre et al. 1995; Escriba, Ozaita et al. 1997; Funari, Barcelo et al. 2003; Vogler, Casas et al. 2004).

Como se demuestra en este trabajo y en los estudios citados, el ácido oleico, a diferencia de sus análogos (ácido eláidico y ácido esteárico) interfiere, debido a su estructura angular, en las interacciones hidrofóbicas de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de membrana, provocando un significativo aumento de la fluidez. Este aumento de la fluidez va a producir importantes modificaciones en las interacciones lipídicas modificándose así la estructura de la bicapa. En este sentido el ácido oleico facilita la formación de la fase no lamelar HII. Estos cambios en la estructura de la membrana van a afectar a la interacción de los lípidos con las proteínas modificándose la actividad de las proteínas periféricas asociadas a la membrana y con acción enzimática en la bicapa lipídica como la $PLC\gamma 1$, $PLC\beta$, adenilato ciclasa, proteínas G, PKC (Casabiell, Pandiella et al. 1991; Escriba, Sastre et al. 1995; Perez, Casabiell et al. 1997; Perez, Camina et al. 1998) y de las proteínas transmembrana como los canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes, las cuales son especialmente sensibles a cambios en el entorno lipídico. Sin embargo las proteínas de membrana que tienen sus dominios funcionales hacia el espacio extracelular, y/o hacia el citosol, no son afectadas por la incorporación de ácido oleico en la membrana plasmática, como sucede en el caso de los dominios de unión del receptor de EGF, del receptor de TRH y del receptor VIP (Casabiell, Zugaza et al. 1993; Zugaza, Casabiell et al. 1995a; Perez, Casabiell et al. 1997; Perez, Camina et al. 1998).

El efecto de los ácidos grasos estudiados en este trabajo, sobre la fluidez de la membrana plasmática en células MS-1 con la consecuente modulación de las rutas moleculares previamente descritas, puede explicar los efectos observados en el ciclo celular. Mientras que el ácido oleico (tipo A) indujo un aceleración en la transición $G0/G1 - S$, en condiciones óptimas de crecimiento,

los ácidos grasos tipo B (ácido elaídico, ácido esteárico) no tuvieron el mismo efecto. Por otra parte, el aumento en la fluidez producido por el ácido oleico, puede estar involucrado en la inhibición de la apoptosis observada en condiciones de serodeprivación. El ácido elaídico, que aumentó la fluidez en menor medida que el oleico, disminuyó también la apoptosis inducida por la serodeprivación, aunque lo hizo en menor medida que el ácido oleico. Finalmente, el ácido esteárico, que indujo efectos opuestos sobre la fluidez de la membrana se asoció con un aumento de la apoptosis.

Tal y como se comentó en el apartado de resultados, en los experimentos de fluorimetría los ácidos grasos se añadieron a las células en un medio libre de proteínas a partir de disoluciones alcohólicas concentradas. Este diseño introduce una diferencia fundamental con lo que ocurre *in vivo*, ya que en condiciones fisiológicas los ácidos grasos que interaccionan con el endotelio vascular van a proceder fundamentalmente de la albúmina. Esta transferencia desde la albúmina a la membrana y viceversa ocurre rápidamente y no requiere de la interacción con otras proteínas ni de catálisis enzimática [el tiempo medio de disociación del ácido oleico de la albúmina es de 5 segundos (Weisiger and Ma 1987)]. Para comprobar el efecto de los ácidos grasos en condiciones más similares a las fisiológicas se realizaron una serie de experimentos control, en los que los ácidos grasos se administraron previamente mezclados con suero fetal, o se administraron a las células en presencia de suero fetal preañadido. Dado que el suero fetal, *per se*, modifica la fluidez de la membrana, fue preciso tener en cuenta este efecto intrínseco del suero para calcular el efecto neto de la adición de ácidos grasos sobre este parámetro. Además, como el suero fetal utilizado contiene de forma natural altas cantidades de colesterol y de ácidos grasos, los experimentos de control se realizaron utilizando suero fetal bovino y suero fetal bovino delipidado.

La adición de suero fetal a las células endoteliales provocó un aumento de la rigidez de membrana proporcional a la concentración del mismo. En otros tipos celulares también se ha demostrado que el suero induce un aumento de la rigidez (Ramirez and Mutharasan 1992). Estudios previos indican que el efecto del suero sobre la fluidez de membrana, se debe al menos en parte a la presencia de albúmina. Se ha demostrado que esta proteína mayoritaria del suero, a una concentración de 1 mg/ml, disminuye la fluidez de membrana en miocitos de aorta humana y de rata y en células endoteliales humanas HUVEC (Beck, Bertolino et al. 1998). En el mismo estudio se demuestra que la albúmina, y no otras proteínas del suero como la γ -globulina o la mioglobina, es capaz de producir la eliminación de ácidos grasos de las membranas celulares, mecanismo que podría ser el responsable del efecto de esta proteína sobre la fluidez. En nuestros experimentos utilizamos una cantidad de suero fetal que condujo a una concentración final de albúmina en el medio de reacción de 0,92 mg/ml, similar a la utilizada en el estudio citado anteriormente (Staines and Price 2003).

Los resultados en estos experimentos de control muestran que, en lo sustancial, los resultados experimentales obtenidos cuando los ácidos grasos se administran conjuntamente con, o en presencia de proteínas séricas (y por tanto en condiciones que se aproximan más a las fisiológicas) son muy similares, una vez descontada la contribución neta del suero sobre los valores de fluidez, a los obtenidos previamente en medio libre de proteínas, con un claro efecto de aumento de la fluidez de membrana cuando las células se exponen a la acción del ácido oleico, un efecto similar pero cuantitativamente menor cuando se utiliza ácido elaídico, y una reducción de la fluidez de membrana cuando se utiliza ácido esteárico. Además, los resultados fueron esencialmente idénticos tanto si se utilizaba suero normal como si se utilizaba suero delipidado, lo que descartaría que los lípidos que de forma natural incorpora el suero fetal estuviesen contribuyendo de forma significativa a los resultados obtenidos. En conjunto, los efectos fueron cualitativamente análogos a los observados cuando los ácidos grasos se añadieron a las células en ausencia de suero (medio acuoso), aunque cuantitativamente fueron mayores en presencia de suero. Esto podría deberse a que en soluciones acuosas a pH 7, condiciones utilizadas en nuestros experimentos, estos ácidos grasos forman micelas al encontrarse fraccionados en su forma protonada y desprotonada (Janke, Bennett et al. 2014), y cabe la posibilidad de que la transferencia de ácidos grasos desde estas micelas a la membrana celular sea menos eficaz que la transferencia desde proteínas ligadoras de ácidos

grasos como la albúmina. Además no se puede descartar que las diferencias observadas en los experimentos de determinación de fluidez de membrana plasmática con ácidos grasos en presencia y ausencia de suero sean debidas a un efecto "*carrier*", en el que la presencia de proteínas minimice posibles interacciones inespecíficas de tipo hidrofóbico entre los ácidos grasos y las paredes de la cubeta de reacción, aumentando así la fracción de ácidos grasos disponible para incorporarse a las membranas.







CONCLUSIONES



6-CONCLUSIONES

- El ácido oleico acelera la entrada en la fase S del ciclo celular en células MS-1 proliferantes.
- El ácido elaídico y el ácido esteárico no tienen efecto sobre la transición entre la fase G0/G1 y la fase S del ciclo celular en células MS-1.
- El ácido oleico inhibe la apoptosis inducida por serodeprivación en células MS-1.
- El ácido elaídico inhibe la apoptosis inducida por serodeprivación en células MS-1, pero en menor medida que el ácido oleico.
- El ácido esteárico aumenta la apoptosis observada en condiciones de serodeprivación en células MS-1.
- El ácido oleico incrementa significativamente la fluidez de membrana de células MS-1, mientras que los efectos de los ácidos elaídico y esteáricos son cuantitativamente menos importantes.
- La estructura de los ácidos grasos, así como su grado de insaturación, determinan la magnitud de sus efectos sobre la fluidez de la membrana plasmática de las células MS-1.
- Los efectos de los ácidos grasos sobre la fluidez de la membrana están correlacionados con su capacidad para reducir la apoptosis en condiciones de serodeprivación en células MS-1.





BIBLIOGRAFÍA



7-BIBLIOGRAFÍA

- Abello, P. A., S. A. Fidler, et al. (1994). "Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin." Arch Surg 129(2): 134-140; discussion 140-131.
- Absi, M., M. P. Burnham, et al. (2007). "Effects of methyl beta-cyclodextrin on EDHF responses in pig and rat arteries; association between SK(Ca) channels and caveolin-rich domains." Br J Pharmacol 151(3): 332-340.
- Aird, W. C. (2005). "Coagulation." Crit Care Med 33(12 Suppl): S485-487.
- Aird, W. C. (2007). "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms." Circ Res 100(2): 158-173.
- Al-Sa'doni, H. and A. Ferro (2000). "S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs." Clin Sci (Lond) 98(5): 507-520.
- Albelda, S. M., C. W. Smith, et al. (1994). "Adhesion molecules and inflammatory injury." FASEB J 8(8): 504-512.
- Alberts, B., D. Bray, et al., Eds. (2006). Introducción a la biología celular. Madrid, Editorial Médica Panamericana.
- Alberts, B., A. Johnson, et al., Eds. (2002). Molecular Biology of the Cell, 4th edition. New York, Garland Science.
- Aloia, R. C. (2013). "Membrane Fluidity in Biology."
- Anggard, E., S. Galton, et al. (1989). "The fate of radioiodinated endothelin-1 and endothelin-3 in the rat." J Cardiovasc Pharmacol 13 Suppl 5: S46-49; discussion S74.
- Arbiser, J. L., M. A. Moses, et al. (1997). "Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways." Proc Natl Acad Sci U S A 94(3): 861-866.
- Armstrong, K. A., B. Hiremagalur, et al. (2005). "Free fatty acids are associated with obesity, insulin resistance, and atherosclerosis in renal transplant recipients." Transplantation 80(7): 937-944.
- Arnould, T., C. Michiels, et al. (1993). "Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1." Am J Physiol 264(5 Pt 1): C1102-1110.
- Arós, F. and R. Estruch (2013). "Mediterranean Diet and Cardiovascular Prevention." Revista Española de Cardiología (English Version) 66(10): 771-774.
- Artwohl, M., A. Lindenmair, et al. (2008). "Different mechanisms of saturated versus polyunsaturated FFA-induced apoptosis in human endothelial cells." J Lipid Res 49(12): 2627-2640.
- Artwohl, M., M. Roden, et al. (2004). "Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells." FASEB J 18(1): 146-148.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science 275(5302): 964-967.
- Ascherio, A., M. B. Katan, et al. (1999). "Trans fatty acids and coronary heart disease." N Engl J Med 340(25): 1994-1998.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science 281(5381): 1305-1308.
- Audi, N., M. D. Mesa, et al. (2007). "Membrane lipid composition of pancreatic AR42J cells: modification by exposure to different fatty acids." Exp Biol Med (Maywood) 232(4): 532-541.
- Augustin, H. G., D. H. Kozian, et al. (1994). "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes." Bioessays 16(12): 901-906.
- Avogaro, A., M. Albiero, et al. (2011). "Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms." Diabetes Care 34 Suppl 2: S285-290.
- Bach-Faig, A., E. M. Berry, et al. (2011). "Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates." Public Health Nutr 14(12A): 2274-2284.
- Badimon, L., J. J. Badimon, et al. (1992). "Endothelium and atherosclerosis." J Hypertens Suppl 10(2): S43-50.

- Badimon, L. and J. Martínez-Gonzalez (2002). "[Endothelium and vascular protection: an update]." Rev Esp Cardiol 55 Suppl 1: 17-26.
- Badimón, L. and J. Martínez-González (2003). "Estatinas y función endotelial." Revista Española de Cardiología 3C: 25-40.
- Badimon, L., J. Martínez-Gonzalez, et al. (2006). "Cell biology and lipoproteins in atherosclerosis." Curr Mol Med 6(5): 439-456.
- Barac, A., U. Campia, et al. (2007). "Methods for evaluating endothelial function in humans." Hypertension 49(4): 748-760.
- Barcelo, F., J. S. Perona, et al. (2009). "Mediterranean-style diet effect on the structural properties of the erythrocyte cell membrane of hypertensive patients: the Prevencion con Dieta Mediterranea Study." Hypertension 54(5): 1143-1150.
- Barlow, R. S., A. M. El-Mowafy, et al. (2000). "H(2)O(2) opens BK(Ca) channels via the PLA(2)-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle." Am J Physiol Heart Circ Physiol 279(2): H475-483.
- Barlow, R. S. and R. E. White (1998). "Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity." Am J Physiol 275(4 Pt 2): H1283-1289.
- Baumgartner-Parzer, S. M. and W. K. Waldhausl (2001). "The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance." Exp Clin Endocrinol Diabetes 109 Suppl 2: S166-179.
- Beaglehole, R. and R. Bonita (2008). "Global public health: a scorecard." The Lancet 372(9654): 1988-1996.
- Beck, R., S. Bertolino, et al. (1998). "Modulation of arachidonic acid release and membrane fluidity by albumin in vascular smooth muscle and endothelial cells." Circ Res 83(9): 923-931.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, et al. (1990). "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide." Proc Natl Acad Sci U S A 87(4): 1620-1624.
- Behrendt, D. and P. Ganz (2002). "Endothelial function. From vascular biology to clinical applications." Am J Cardiol 90(10C): 40L-48L.
- Bemelmans, W. J., J. D. Lefrandt, et al. (2002). "Change in saturated fat intake is associated with progression of carotid and femoral intima-media thickness, and with levels of soluble intercellular adhesion molecule-1." Atherosclerosis 163(1): 113-120.
- Ben-Yosef, Y., A. Miller, et al. (2005). "Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death." Am J Physiol Cell Physiol 289(5): C1321-1331.
- Bennett, M. R. (1999). "Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture." Cardiovasc Res 41(2): 361-368.
- Berk, B. C., J. I. Abe, et al. (2001). "Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms." Ann N Y Acad Sci 947: 93-109; discussion 109-111.
- Berliner, J. A. and J. W. Heinecke (1996). "The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis." Free Radic Biol Med 20(5): 707-727.
- Berridge, M. J. (1987). "Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers." Annu Rev Biochem 56: 159-193.
- Bhosle, S. M., N. G. Huilgol, et al. (2005). "Apoptotic index as predictive marker for radiosensitivity of cervical carcinoma: evaluation of membrane fluidity, biochemical parameters and apoptosis after the first dose of fractionated radiotherapy to patients." Cancer Detect Prev 29(4): 369-375.
- Bishop-Bailey, D. and T. Hla (1999). "Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2." J Biol Chem 274(24): 17042-17048.
- Blanco-Colio, L. M., M. A. Hernández-Presa, et al. (2000). "Papel potencial de la apoptosis en la aterosclerosis." Cardiovascular Risk Factors 9: 131-137.
- Bogdanov, M., J. Sun, et al. (1996). "A phospholipid acts as a chaperone in assembly of a membrane transport protein." J Biol Chem 271(20): 11615-11618.

- Bogle, R. G., R. J. MacAllister, et al. (1995). "Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases?" Am J Physiol 269(3 Pt 1): C750-756.
- Bombeli, T., A. Karsan, et al. (1997). "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant." Blood 89(7): 2429-2442.
- Bombeli, T., B. R. Schwartz, et al. (1999). "Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets." Blood 93(11): 3831-3838.
- Boren, J., K. Olin, et al. (1998). "Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding." J Clin Invest 101(12): 2658-2664.
- Borovyagin, V. L. and A. G. Sabelnikov (1989). "Lipid polymorphism of model and cellular membranes as revealed by electron microscopy." Electron Microsc Rev 2(1): 75-115.
- Bothig, S. (1989). "WHO MONICA Project: objectives and design." Int J Epidemiol 18(3 Suppl 1): S29-37.
- Boulanger, C. and T. F. Luscher (1990). "Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide." J Clin Invest 85(2): 587-590.
- Brown, C. D., K. Barnes, et al. (2000). "Functional significance of the isoforms of endothelin-converting enzyme-1." J Cardiovasc Pharmacol 36(5 Suppl 1): S26-27.
- Buckman, D. K., R. S. Chapkin, et al. (1990). "Modulation of mouse mammary tumor growth and linoleate enhanced metastasis by oleate." J Nutr 120(2): 148-157.
- Buchman, T. G., P. A. Abello, et al. (1993). "Induction of heat shock response leads to apoptosis in endothelial cells previously exposed to endotoxin." Am J Physiol 265(1 Pt 2): H165-170.
- Buikema, H., W. H. van Gilst, et al. (1993). "Endothelium dependent relaxation in two different models of chronic heart failure and the effect of ibopamine." Cardiovasc Res 27(12): 2118-2124.
- Carlos, T. M. and J. M. Harlan (1994). "Leukocyte-endothelial adhesion molecules." Blood 84(7): 2068-2101.
- Carluccio, M. A., M. Massaro, et al. (1999). "Oleic acid inhibits endothelial activation : A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet." Arterioscler Thromb Vasc Biol 19(2): 220-228.
- Casabiell, X., A. Pandiella, et al. (1991). "Regulation of epidermal-growth-factor-receptor signal transduction by cis-unsaturated fatty acids. Evidence for a protein kinase C-independent mechanism." Biochem J 278 (Pt 3): 679-687.
- Casabiell, X., J. L. Zugaza, et al. (1993). "Oleic acid blocks epidermal growth factor-activated early intracellular signals without altering the ensuing mitogenic response." Exp Cell Res 205(2): 365-373.
- Casanueva, F. F., L. Villanueva, et al. (1987). "Free fatty acids block growth hormone (GH) releasing hormone-stimulated GH secretion in man directly at the pituitary." J Clin Endocrinol Metab 65(4): 634-642.
- Celermajer, D. S. (1997). "Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible?" J Am Coll Cardiol 30(2): 325-333.
- Cines, D. B., E. S. Pollak, et al. (1998). "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." Blood 91(10): 3527-3561.
- Coleman, R. A., W. L. Smith, et al. (1994). "International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes." Pharmacol Rev 46(2): 205-229.
- Corella, D., P. Carrasco, et al. (2013). "Mediterranean diet reduces the adverse effect of the TCF7L2-rs7903146 polymorphism on cardiovascular risk factors and stroke incidence: a randomized controlled trial in a high-cardiovascular-risk population." Diabetes Care 36(11): 3803-3811.
- Corella, D., J. I. Gonzalez, et al. (2009). "Polymorphisms cyclooxygenase-2 -765G>C and interleukin-6 -174G>C are associated with serum inflammation markers in a high cardiovascular risk population and do not modify the response to a Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil or nuts." J Nutr 139(1): 128-134.
- Covas, M. I. (2007). "Olive oil and the cardiovascular system." Pharmacol Res 55(3): 175-186.

- Cuevas, A. M. and A. M. Germain (2004). "Diet and endothelial function." *Biol Res* 37(2): 225-230.
- Cui, Z., M. Houweling, et al. (1996). "A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* 271(25): 14668-14671.
- Cullis, P. R. and B. de Kruijff (1979). "Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes." *Biochim Biophys Acta* 559(4): 399-420.
- Cham, B. E. and B. R. Knowles (1976). "A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation." *J Lipid Res* 17(2): 176-181.
- Chang, J., J. H. Musser, et al. (1987). "Phospholipase A2: function and pharmacological regulation." *Biochem Pharmacol* 36(15): 2429-2436.
- Choi, K. B., F. Wong, et al. (1998). "Lipopolysaccharide mediates endothelial apoptosis by a FADD-dependent pathway." *J Biol Chem* 273(32): 20185-20188.
- Choy, J. C., D. J. Granville, et al. (2001). "Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis." *J Mol Cell Cardiol* 33(9): 1673-1690.
- Damasceno, N. R., A. Sala-Vila, et al. (2013). "Mediterranean diet supplemented with nuts reduces waist circumference and shifts lipoprotein subfractions to a less atherogenic pattern in subjects at high cardiovascular risk." *Atherosclerosis* 230(2): 347-353.
- Darzynkiewicz, Z., S. Bruno, et al. (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." *Cytometry* 13(8): 795-808.
- Davies, P. F., A. Remuzzi, et al. (1986). "Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(7): 2114-2117.
- de Kruijff, B. (1997). "Biomembranes. Lipids beyond the bilayer." *Nature* 386(6621): 129-130.
- de las Heras, N., E. Cediël, et al. (2003). "Comparison between the effects of mixed dyslipidaemia and hypercholesterolaemia on endothelial function, atherosclerotic lesions and fibrinolysis in rabbits." *Clin Sci (Lond)* 104(4): 357-365.
- de Lorgeril, M., P. Salen, et al. (1999). "Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study." *Circulation* 99(6): 779-785.
- de Vries, J. E., M. M. Vork, et al. (1997). "Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes." *J Lipid Res* 38(7): 1384-1394.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* 22(53): 8543-8567.
- Dejana, E., M. Corada, et al. (1995). "Endothelial cell-to-cell junctions." *FASEB J* 9(10): 910-918.
- del Zoppo, G. J. and R. Milner (2006). "Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(9): 1966-1975.
- Delhanty, P. J., A. van Kerkwijk, et al. (2010). "Unsaturated fatty acids prevent desensitization of the human growth hormone secretagogue receptor by blocking its internalization." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299(3): E497-505.
- desBordes, C. and M. A. Lea (1995). "Effects of C18 fatty acid isomers on DNA synthesis in hepatoma and breast cancer cells." *Anticancer Res* 15(5B): 2017-2021.
- Dias, V. C. and H. G. Parsons (1995). "Modulation in delta 9, delta 6, and delta 5 fatty acid desaturase activity in the human intestinal CaCo-2 cell line." *J Lipid Res* 36(3): 552-563.
- Dimmeler, S., I. Fleming, et al. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." *Nature* 399(6736): 601-605.
- Dimmeler, S., J. Haendeler, et al. (1997a). "Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis." *Circulation* 95(7): 1760-1763.
- Dimmeler, S., J. Haendeler, et al. (1997). "Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases." *J Exp Med* 185(4): 601-607.
- Dimmeler, S., J. Haendeler, et al. (1996). "Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells." *FEBS Lett* 399(1-2): 71-74.
- Dimmeler, S., J. Haendeler, et al. (2002). "Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis." *Curr Opin Lipidol* 13(5): 531-536.
- Dimmeler, S., C. Hermann, et al. (1999). "Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3): 656-664.

- Dimmeler, S., V. Rippmann, et al. (1997). "Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide." Circ Res 81(6): 970-976.
- Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (2000). "Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression." Circ Res 87(6): 434-439.
- Drexler, H. (1998). "Factors involved in the maintenance of endothelial function." Am J Cardiol 82(10A): 3S-4S.
- Dvorak, H. F., L. F. Brown, et al. (1995). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis." Am J Pathol 146(5): 1029-1039.
- el Touny, S., W. Khan, et al. (1990). "Regulation of platelet protein kinase C by oleic acid. Kinetic analysis of allosteric regulation and effects on autophosphorylation, phorbol ester binding, and susceptibility to inhibition." J Biol Chem 265(27): 16437-16443.
- Ellis, A. and C. R. Triggle (2003). "Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone." Can J Physiol Pharmacol 81(11): 1013-1028.
- Emerson, G. G. and S. S. Segal (2000). "Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control." Circ Res 87(6): 474-479.
- Emerson, G. G. and S. S. Segal (2001). "Electrical activation of endothelium evokes vasodilation and hyperpolarization along hamster feed arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol 280(1): H160-167.
- Emoto, K., T. Kobayashi, et al. (1996). "Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis." Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 12867-12872.
- Engelbrecht, A. M., L. Louw, et al. (1998). "Comparison of the fatty acid compositions in intraepithelial and infiltrating lesions of the cervix: part II, free fatty acid profiles." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 59(4): 253-257.
- Engelhard, V. H., J. D. Esko, et al. (1976). "Modification of adenylate cyclase activity in LM cells by manipulation of the membrane phospholipid composition in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 73(12): 4482-4486.
- Epand, R. M. (1998). "Lipid polymorphism and protein-lipid interactions." Biochim Biophys Acta 1376(3): 353-368.
- Escriba, P. V., A. Ozaita, et al. (1997). "Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes." Proc Natl Acad Sci U S A 94(21): 11375-11380.
- Escriba, P. V., J. M. Sanchez-Dominguez, et al. (2003). "Alteration of lipids, G proteins, and PKC in cell membranes of elderly hypertensives." Hypertension 41(1): 176-182.
- Escriba, P. V., M. Sastre, et al. (1995). "Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures." Proc Natl Acad Sci U S A 92(16): 7595-7599.
- Escudero, A., J. C. Montilla, et al. (1998). "Effect of dietary (n-9), (n-6) and (n-3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes." Biochim Biophys Acta 1394(1): 65-73.
- Esper, R. J., R. A. Nordaby, et al. (2006). "Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal." Cardiovasc Diabetol 5: 4.
- Esposito, K., R. Marfella, et al. (2004). "Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial." JAMA 292(12): 1440-1446.
- Estruch, R. (2014). "Cardiovascular mortality: how can it be prevented?" Nefrologia 34(5): 561-569.
- Estruch, R., M. A. Martinez-Gonzalez, et al. (2006). "Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial." Ann Intern Med 145(1): 1-11.
- Estruch, R., E. Ros, et al. (2013). "Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet." N Engl J Med 368(14): 1279-1290.
- Fagot-Campagna, A., B. Balkau, et al. (1998). "High free fatty acid concentration: an independent risk factor for hypertension in the Paris Prospective Study." Int J Epidemiol 27(5): 808-813.

- Farb, A., A. P. Burke, et al. (1996). "Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death." Circulation 93(7): 1354-1363.
- Farber, A., T. Kitzmiller, et al. (1999). "A caspase inhibitor decreases oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in bovine endothelial cells." J Surg Res 85(2): 323-330.
- Favero, G., C. Paganelli, et al. (2014). "Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention." Biomed Res Int 2014: 801896.
- Feletou, M., E. Bonnardel, et al. (1996). "Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide." Br J Pharmacol 118(6): 1371-1376.
- Feletou, M., M. Boulanger, et al. (2003). "Fructose diet and VEGF-induced plasma extravasation in hamster cheek pouch." Acta Pharmacol Sin 24(3): 207-211.
- Feletou, M., J. Stacek, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor and the in vivo increase in plasma extravasation in the hamster cheek pouch." Br J Pharmacol 132(6): 1342-1348.
- Fisslthaler, B., R. Popp, et al. (1999). "Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries." Nature 401(6752): 493-497.
- Fito, M., M. Guxens, et al. (2007). "Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial." Arch Intern Med 167(11): 1195-1203.
- Florey (1966). "The endothelial cell." Br Med J 2(5512): 487-490.
- Forman, M. B., D. W. Puett, et al. (1989). "Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: pathogenesis and therapeutic implications." J Am Coll Cardiol 13(2): 450-459.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation 113(13): 1708-1714.
- Funari, S. S., F. Barcelo, et al. (2003). "Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes." J Lipid Res 44(3): 567-575.
- Fung, T. T., K. M. Rexrode, et al. (2009). "Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women." Circulation 119(8): 1093-1100.
- Galle, J., R. Schneider, et al. (1999). "Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress." Kidney Int 55(4): 1450-1461.
- Galli, G. and M. Fratelli (1993). "Activation of apoptosis by serum deprivation in a teratocarcinoma cell line: inhibition by L-acetylcarnitine." Exp Cell Res 204(1): 54-60.
- Garcia-Cardena, G., R. Fan, et al. (1996). "Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1." J Biol Chem 271(44): 27237-27240.
- Garg, U. C. and A. Hassid (1989). "Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells." J Clin Invest 83(5): 1774-1777.
- Garrido, J. A. and P. Mata (1994). Tratamiento dietético de las dislipemias. Metabolismo lipídico. Investigación en Biomedicina. O. M. Madrid: 253-270.
- Gebremedhin, D., A. R. Lange, et al. (2000). "Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow." Circ Res 87(1): 60-65.
- Giardina, J. B., G. M. Green, et al. (2001). "Role of endothelin B receptors in enhancing endothelium-dependent nitric oxide-mediated vascular relaxation during high salt diet." Hypertension 37(2 Pt 2): 516-523.
- Gibbons, G. H. (1997). "Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target." Am J Cardiol 79(5A): 3-8.
- Gimbrone, M. A., Jr., T. Nagel, et al. (1997). "Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology." J Clin Invest 100(11 Suppl): S61-65.
- Giorgione, J., R. M. Epand, et al. (1995). "Role of phospholipids containing docosahexaenoyl chains in modulating the activity of protein kinase C." Proc Natl Acad Sci U S A 92(21): 9767-9770.
- Girard, J. P. and T. A. Springer (1995). "High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration." Immunol Today 16(9): 449-457.
- Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." Cell 104(4): 503-516.
- Goldstein, J. L., M. S. Brown, et al. (1985). "Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system." Annu Rev Cell Biol 1: 1-39.

- González, I. (1997). "Hipertensión arterial, diabetes y arteriosclerosis. La encrucijada del endotelio (I)." Hipertensión 14: 163-172.
- Gori, T., S. Dragoni, et al. (2007). "Endothelium and haemorheology." Ann Ist Super Sanita 43(2): 124-129.
- Gross, P. L. and W. C. Aird (2000). "The endothelium and thrombosis." Semin Thromb Hemost 26(5): 463-478.
- Gross, S. S. and M. S. Wolin (1995). "Nitric oxide: pathophysiological mechanisms." Annu Rev Physiol 57: 737-769.
- Grundty, S. M. (1997). "What is the desirable ratio of saturated, polyunsaturated, and monounsaturated fatty acids in the diet?" The American Journal of Clinical Nutrition 66(4): 988S-990S.
- Gryglewski, R. (1983). "Prostacyclin--experimental and clinical approach." Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res 11: 457-461.
- Gryglewski, R. J. (1979). "Prostacyclin as a circulatory hormone." Biochem Pharmacol 28(21): 3161-3166.
- Gudi, S., J. P. Nolan, et al. (1998). "Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition." Proc Natl Acad Sci U S A 95(5): 2515-2519.
- Guillén, N., S. Acín, et al. (2009). "Knowledge of the Biological Actions of Extra Virgin Olive Oil Gained From Mice Lacking Apolipoprotein E." Revista Española de Cardiología (English Version) 62(03): 294-304.
- Haendeler, J., A. M. Zeiher, et al. (1996). "Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax." Eur J Pharmacol 317(2-3): 407-411.
- Haimovitz-Friedman, A., C. Cordon-Cardo, et al. (1997). "Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation." J Exp Med 186(11): 1831-1841.
- Halushka, P. V., D. E. Mais, et al. (1989). "Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol 29: 213-239.
- Hampton, M. J., R. A. Floyd, et al. (1980). "Studies of the fatty acid composition and membrane microviscosity in Salmonella typhimurium TA98." Chem Phys Lipids 27(2): 177-183.
- Harada-Shiba, M., M. Kinoshita, et al. (1998). "Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms." J Biol Chem 273(16): 9681-9687.
- Harvey, K. A., C. L. Walker, et al. (2010a). "Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth." Clin Nutr 29(4): 492-500.
- Harvey, K. A., C. L. Walker, et al. (2010). "Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells." J Lipid Res 51(12): 3470-3480.
- Harvey, K. A., C. L. Walker, et al. (2012). "Trans fatty acids: induction of a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells." Lipids 47(7): 647-657.
- Hashimoto, M., S. Hossain, et al. (1999). "Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on plasma membrane fluidity of aortic endothelial cells." Lipids 34(12): 1297-1304.
- Hausenloy, D. J. and D. M. Yellon (2008). "Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels." Postgrad Med J 84(997): 590-598.
- Hawkins, B. T. and T. P. Davis (2005). "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease." Pharmacol Rev 57(2): 173-185.
- Haynes, W. G. and D. J. Webb (1998). "Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease." J Hypertens 16(8): 1081-1098.
- Heermeier, K., R. Schneider, et al. (1999). "Oxidative stress mediates apoptosis induced by oxidized low-density lipoprotein and oxidized lipoprotein(a)." Kidney Int 56(4): 1310-1312.
- Hennig, B., M. Toborek, et al. (2001). "High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis." J Am Coll Nutr 20(2 Suppl): 97-105.
- Hermann, C., A. M. Zeiher, et al. (1997). "Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase." Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(12): 3588-3592.

- Herrmann, J. and A. Lerman (2001). "The endothelium: dysfunction and beyond." J Nucl Cardiol 8(2): 197-206.
- Hirata, Y., T. Emori, et al. (1993). "Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells." J Clin Invest 91(4): 1367-1373.
- Ho, F. M., S. H. Liu, et al. (2000). "High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3." Circulation 101(22): 2618-2624.
- Hobbs, H. H., M. S. Brown, et al. (1986). "Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia." J Biol Chem 261(28): 13114-13120.
- Hochachka, P. W. (1986). "Defense strategies against hypoxia and hypothermia." Science 231(4735): 234-241.
- Hogg, N., J. Browning, et al. (1999). "Apoptosis in vascular endothelial cells caused by serum deprivation, oxidative stress and transforming growth factor-beta." Endothelium 7(1): 35-49.
- Hoover, R. L., D. K. Bhalla, et al. (1980). "Effects of linoleic acid on capping, lectin mediated mitogenesis, surface antigen expression, and fluorescent polarization in lymphocytes and BHK cells." J Cell Physiol 103(3): 399-406.
- http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/. (2015). Retrieved 12 de septiembre de 2015.
- Innis, S. M. and M. T. Clandinin (1981). "Dynamic modulation of mitochondrial membrane physical properties and ATPase activity by diet lipid." Biochem J 198(1): 167-175.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." Proc Natl Acad Sci U S A 86(8): 2863-2867.
- Inoue, M., N. Watanabe, et al. (1991). "Expression of a hybrid Cu/Zn-type superoxide dismutase which has high affinity for heparin-like proteoglycans on vascular endothelial cells." J Biol Chem 266(25): 16409-16414.
- Jaffe, E. A., Ed. (1996). Physiologic functions of normal endothelial cells. Vascular Medicine. Boston, Little, Brown and Company.
- Janke, J. J., W. F. Bennett, et al. (2014). "Oleic acid phase behavior from molecular dynamics simulations." Langmuir 30(35): 10661-10667.
- Jat, P. S. and P. A. Sharp (1989). "Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large-T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature." Mol Cell Biol 9(4): 1672-1681.
- Jihan Seid, H. (2013). "Cell membrane fatty acids and health." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 5, Suppl 3,: 38-46.
- Johnson-Tidey, R. R., J. L. McGregor, et al. (1994). "Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1." Am J Pathol 144(5): 952-961.
- Kaiser, N. and I. S. Edelman (1978). "Further studies on the role of calcium in glucocorticoid-induced lymphocytolysis." Endocrinology 103(3): 936-942.
- Karnovsky, M. J. (1979). "Lipid domains in biological membranes: their structural and functional perturbation by free fatty acids and the regulation of receptor mobility. Co-presidential address." Am J Pathol 97(2): 212-221.
- Katan, M. B. (1995). "Exit trans fatty acids." Lancet 346(8985): 1245-1246.
- Kawashima, S. and M. Yokoyama (2004). "Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(6): 998-1005.
- Keppel, G. and T. D. Wickens (2004). Design and analysis: A researchers handbook (4rd Edition). UpperSaddleRiver, NJ, Pearson.
- Keys, A., A. Menotti, et al. (1986). "The diet and 15-year death rate in the seven countries study." Am J Epidemiol 124(6): 903-915.
- Khan, W. A., G. Blobe, et al. (1993). "Selective regulation of protein kinase C isoenzymes by oleic acid in human platelets." J Biol Chem 268(7): 5063-5068.

- Khan, W. A., G. C. Blobe, et al. (1992). "Activation of protein kinase C by oleic acid. Determination and analysis of inhibition by detergent micelles and physiologic membranes: requirement for free oleate." J Biol Chem 267(6): 3605-3612.
- Kiely, D. G., R. I. Cargill, et al. (1997). "Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in man." Cardiovasc Res 33(2): 378-386.
- Kimelberg, H. K. (1977). Influence of membrane fluidity on the activity of membrane-bound enzymes. Aspects of Cell Surface Organization. . Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. Cell Surface Reviews. G. P. y. G. L. Nicolson. Amsterdam, Elsevier. Vol. 3: 205-293.
- Kimura, M., K. Maeda, et al. (1992). "Cytosolic calcium increase in coronary endothelial cells after H₂O₂ exposure and the inhibitory effect of U78517F." Br J Pharmacol 107(2): 488-493.
- Klausner, R. D., D. K. Bhalla, et al. (1980). "Model for capping derived from inhibition of surface receptor capping by free fatty acids." Proc Natl Acad Sci U S A 77(1): 437-441.
- Klausner, R. D., A. M. Kleinfeld, et al. (1980). "Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis." J Biol Chem 255(4): 1286-1295.
- Knoops, K. T., L. C. de Groot, et al. (2004). "Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project." JAMA 292(12): 1433-1439.
- Kockx, M. M., G. R. De Meyer, et al. (1998). "Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques." Circulation 97(23): 2307-2315.
- Komarova, Y. and A. B. Malik (2010). "Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways." Annu Rev Physiol 72: 463-493.
- Kondo, S., Y. Kondo, et al. (1996). "Involvement of interleukin-1 beta-converting enzyme in apoptosis of bFGF-deprived murine aortic endothelial cells." FASEB J 10(10): 1192-1197.
- Konstantinidou, V., M. I. Covas, et al. (2010). "In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial." FASEB J 24(7): 2546-2557.
- Kouris-Blazos, A., C. Gnardellis, et al. (1999). "Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia." Br J Nutr 82(1): 57-61.
- Koval, M. and J. Battacharya (2006). Microvascular research: [biology and pathology]. Amsterdam, Elsevier Academic Press.
- Kubes, P., M. Suzuki, et al. (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A 88(11): 4651-4655.
- Kubo, S. H., T. S. Rector, et al. (1991). "Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure." Circulation 84(4): 1589-1596.
- Kuo, P., M. Weinfeld, et al. (1990). "Plasma membrane enrichment with cis-unsaturated fatty acids enhances LDL metabolism in U937 monocytes." Arteriosclerosis 10(1): 111-118.
- Labarca, C. and K. Paigen (1980). "A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure." Anal Biochem 102(2): 344-352.
- Lahoz, C. and J. M. Mostaza (2007). "La aterosclerosis como enfermedad sistémica." Revista Española de Cardiología 60(02): 184-195.
- Lakowicz, J. R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy, 2^a Edition Baltimore, Kluwer Academic-Plenum Publishers.
- Landmesser, U., B. Hornig, et al. (2004). "Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?" Circulation 109(21 Suppl 1): II27-33.
- Lasheras, C., S. Fernandez, et al. (2000). "Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people." Am J Clin Nutr 71(4): 987-992.
- Lehninger, A. L. (2009). Principios de Bioquímica. Barcelona, Omega.
- Lehrman, M. A., J. L. Goldstein, et al. (1985). "Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain." Cell 41(3): 735-743.
- Levick, J. R. (2010). An introduction to cardiovascular physiology. London.

- Levick, J. R. and C. C. Michel (2010). "Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle." Cardiovasc Res 87(2): 198-210.
- Li, D., K. Tomson, et al. (1999). "Modulation of constitutive nitric oxide synthase, bcl-2 and Fas expression in cultured human coronary endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation and angiotensin II: role of AT1 receptor activation." Cardiovasc Res 41(1): 109-115.
- Li, D., B. Yang, et al. (1998). "Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas." Am J Physiol 275(2 Pt 2): H568-576.
- Li, D., B. Yang, et al. (1999). "Proapoptotic effects of ANG II in human coronary artery endothelial cells: role of AT1 receptor and PKC activation." Am J Physiol 276(3 Pt 2): H786-792.
- Li, J., S. P. Zhao, et al. (1997). "Non-invasive detection of endothelial dysfunction in patients with essential hypertension." Int J Cardiol 61(2): 165-169.
- Lichtenstein, A. H. (2000). "Trans fatty acids and cardiovascular disease risk." Curr Opin Lipidol 11(1): 37-42.
- Lincoln, T. M., P. Komalavilas, et al. (1994). "Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase." Hypertension 23(6 Pt 2): 1141-1147.
- Lindblom, G. and L. Rilfors (1990). Structures Formed by Membrane Lipids — Physicochemical Properties and Possible Biological Relevance for Membrane Function. Dynamics and Biogenesis of Membranes. J. A. F. Op den Kamp, Springer Berlin Heidelberg. 40: 43-64.
- Litman, B. J., S. L. Niu, et al. (2001). "The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction." J Mol Neurosci 16(2-3): 237-242; discussion 279-284.
- Liu, S. M., K. E. Magnusson, et al. (1993). "Microtubules are involved in transport of macromolecules by vesicles in cultured bovine aortic endothelial cells." J Cell Physiol 156(2): 311-316.
- Lockwich, T. P., X. Liu, et al. (2000). "Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains." J Biol Chem 275(16): 11934-11942.
- Lokesh, B. R. and M. Wrann (1984). "Incorporation of palmitic acid or oleic acid into macrophage membrane lipids exerts differential effects on the function of normal mouse peritoneal macrophages." Biochim Biophys Acta 792(2): 141-148.
- Lopez-Garcia, E., M. B. Schulze, et al. (2005). "Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction." J Nutr 135(3): 562-566.
- Lopez-Segura, F., F. Velasco, et al. (1996). "Monounsaturated fatty acid-enriched diet decreases plasma plasminogen activator inhibitor type 1." Arterioscler Thromb Vasc Biol 16(1): 82-88.
- Lu, G., T. A. Morinelli, et al. (1996). "Oleic acid-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. A role for protein kinase C." Circ Res 79(3): 611-618.
- Lum, H. and A. B. Malik (1994). "Regulation of vascular endothelial barrier function." Am J Physiol 267(3 Pt 1): L223-241.
- Lum, H. and A. B. Malik (1996). "Mechanisms of increased endothelial permeability." Can J Physiol Pharmacol 74(7): 787-800.
- Lupu, C., A. D. Westmuckett, et al. (2005). "Tissue factor-dependent coagulation is preferentially up-regulated within arterial branching areas in a baboon model of Escherichia coli sepsis." Am J Pathol 167(4): 1161-1172.
- Llorente-Cortes, V., R. Estruch, et al. (2010). "Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk." Atherosclerosis 208(2): 442-450.
- MacIntyre, D. E., R. L. Hoover, et al. (1984). "Inhibition of platelet function by cis-unsaturated fatty acids." Blood 63(4): 848-857.
- Makita, K., J. R. Falck, et al. (1996). "Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system." FASEB J 10(13): 1456-1463.
- Mallat, Z. and A. Tedgui (2000). "Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance." Br J Pharmacol 130(5): 947-962.
- Mann, G. E., D. L. Yudilevich, et al. (2003). "Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells." Physiol Rev 83(1): 183-252.

- Marks, D. S., J. A. Vita, et al. (1995). "Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide." J Clin Invest 96(6): 2630-2638.
- Martikainen, P. and J. Isaacs (1990). "Role of calcium in the programmed death of rat prostatic glandular cells." Prostate 17(3): 175-187.
- Martín Bautista, E. C. (2006). Efectos de la intervención nutricional con un preparado lácteo enriquecido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico y vitaminas sobre marcadores relacionados con el riesgo cardiovascular y con el metabolismo óseo en pacientes deslipémicos. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Nutrición y Salud. Granada, Universidad de Granada: 195.
- Martinez-Gonzalez, M. A., D. Corella, et al. (2012). "Cohort profile: design and methods of the PREDIMED study." Int J Epidemiol 41(2): 377-385.
- Martinez-Gonzalez, M. A., E. Fernandez-Jarne, et al. (2002). "Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score." Eur J Nutr 41(4): 153-160.
- Massaro, M. and R. De Caterina (2002). "Vasculoprotective effects of oleic acid: epidemiological background and direct vascular antiatherogenic properties." Nutr Metab Cardiovasc Dis 12(1): 42-51.
- Massberg, S., M. Sausbier, et al. (1999). "Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I." J Exp Med 189(8): 1255-1264.
- Mata, P., R. Alonso, et al. (1996). "Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro." Arterioscler Thromb Vasc Biol 16(11): 1347-1355.
- Mata, P., O. Varela, et al. (1997). "Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(10): 2088-2095.
- Matsushima, K. and J. J. Oppenheim (1989). "Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF." Cytokine 1(1): 2-13.
- McConkey, D. J. and S. Orrenius (1996). "The role of calcium in the regulation of apoptosis." J Leukoc Biol 59(6): 775-783.
- McConkey, D. J. and S. Orrenius (1996a). "Signal transduction pathways in apoptosis." Stem Cells 14(6): 619-631.
- McGiff, J. C. and J. Quilley (1999). "20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings." Am J Physiol 277(3 Pt 2): R607-623.
- McKee, T. and J. R. McKee, Eds. (2003). Bioquímica: La base molecular de la vida. Interamericana.
- Mehta, D. and A. B. Malik (2006). "Signaling mechanisms regulating endothelial permeability." Physiol Rev 86(1): 279-367.
- Mena, M. P., E. Sacanella, et al. (2009). "Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet." Am J Clin Nutr 89(1): 248-256.
- Mendelsohn, M. E., S. O'Neill, et al. (1990). "Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine." J Biol Chem 265(31): 19028-19034.
- Mendis, S., P. Puska, et al., Eds. (2011). Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. Switzerland, World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization.
- Mensink, R. P. and M. B. Katan (1990). "Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects." N Engl J Med 323(7): 439-445.
- Michel, C. C. and F. E. Curry (1999). "Microvascular permeability." Physiol Rev 79(3): 703-761.
- Minami, T. and W. C. Aird (2005). "Endothelial cell gene regulation." Trends Cardiovasc Med 15(5): 174-184.
- Minshall, R. D. and A. B. Malik (2006). "Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 1): 107-144.

- Mitra, D., J. Kim, et al. (1998). "Role of caspases 1 and 3 and Bcl-2-related molecules in endothelial cell apoptosis associated with thrombotic microangiopathies." Am J Hematol 59(4): 279-287.
- Mitrou, P. N., V. Kipnis, et al. (2007). "Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study." Arch Intern Med 167(22): 2461-2468.
- Miyasaka, M. and T. Tanaka (2004). "Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas." Nat Rev Immunol 4(5): 360-370.
- Molnar, M. and F. Hertelendy (1995). "Signal transduction in rat myometrial cells: comparison of the actions of endothelin-1, oxytocin and prostaglandin F2 alpha." Eur J Endocrinol 133(4): 467-474.
- Mombouli, J. V. and P. M. Vanhoutte (1999). "Endothelial dysfunction: from physiology to therapy." J Mol Cell Cardiol 31(1): 61-74.
- Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev 43(2): 109-142.
- Morales Villegas, E. C., Ed. (2011). Endotelio, Aterotrombosis y Estatinas. Atlas Ilustrado. Aguascalientes, México Editorial Atheros - CIC Aguascalientes, S.A de C.V.
- Moreno, J. J. and M. T. Mitjavila (2003). "The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review)." J Nutr Biochem 14(4): 182-195.
- Mozaffarian, D., M. B. Katan, et al. (2006). "Trans fatty acids and cardiovascular disease." N Engl J Med 354(15): 1601-1613.
- Mu, Y. M., T. Yanase, et al. (2001). "Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells." Endocrinology 142(8): 3590-3597.
- Murie-Fernandez, M., P. Irimia, et al. (2011). "Carotid intima-media thickness changes with Mediterranean diet: a randomized trial (PREDIMED-Navarra)." Atherosclerosis 219(1): 158-162.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." Cell 85(6): 817-827.
- Nabel, E. G. and E. Braunwald (2012). "A tale of coronary artery disease and myocardial infarction." N Engl J Med 366(1): 54-63.
- Nakamura, M. T. and T. Y. Nara (2004). "Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases." Annu Rev Nutr 24: 345-376.
- Nelson, M. T., Y. Huang, et al. (1990). "Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels." Nature 344(6268): 770-773.
- Nicolaiew, N., N. Lemort, et al. (1998). "Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation." Ann Nutr Metab 42(5): 251-260.
- Nichols, M., N. Townsend, et al. (2012). European Cardiovascular Disease Statistics. Brussels, Published by the European Heart Network AISBL.
- Nist/Sematech. (2015). "e-Handbook of Statistical Methods." Retrieved 03/05, 2015, from <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>.
- North, P. and S. Fleischer (1983). "Alteration of synaptic membrane cholesterol/phospholipid ratio using a lipid transfer protein. Effect on gamma-aminobutyric acid uptake." J Biol Chem 258(2): 1242-1253.
- Ntambi, J. M. and H. Bene (2001). "Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression." J Mol Neurosci 16(2-3): 273-278; discussion 279-284.
- Nunez, D., J. Randon, et al. (1990). "The inhibition of platelet-activating factor-induced platelet activation by oleic acid is associated with a decrease in polyphosphoinositide metabolism." J Biol Chem 265(30): 18330-18338.
- Pagnan, A., R. Corrocher, et al. (1989). "Effects of an olive-oil-rich diet on erythrocyte membrane lipid composition and cation transport systems." Clin Sci (Lond) 76(1): 87-93.
- Palmer, R. M., D. S. Ashton, et al. (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature 333(6174): 664-666.

- Panagiotakos, D. B., C. Pitsavos, et al. (2002). "Risk stratification of coronary heart disease in Greece: final results from the CARDIO2000 Epidemiological Study." Prev Med 35(6): 548-556.
- Passerini, A. G., D. C. Polacek, et al. (2004). "Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta." Proc Natl Acad Sci U S A 101(8): 2482-2487.
- Pasyk, K. A. and B. A. Jakobczak (2004). "Vascular endothelium: recent advances." Eur J Dermatol 14(4): 209-213.
- Pawson, T. (1995). "Protein modules and signalling networks." Nature 373(6515): 573-580.
- Perez-Jimenez, F., P. Castro, et al. (1999). "Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat." Atherosclerosis 145(2): 351-358.
- Perez, F. R., J. P. Camina, et al. (1998). "Cis-unsaturated free fatty acids block VIP-mediated GH and PRL secretion by perturbing the cAMP/protein kinase A pathway." Pituitary 1(1): 25-32.
- Perez, F. R., J. P. Camina, et al. (1997a). "cis-FFA do not alter membrane depolarization but block Ca²⁺ influx and GH secretion in KCl-stimulated somatotroph cells. Suggestion for a direct cis-FFA perturbation of the Ca²⁺ channel opening." Biochim Biophys Acta 1329(2): 269-277.
- Perez, F. R., X. Casabiell, et al. (1997). "cis-unsaturated free fatty acids block growth hormone and prolactin secretion in thyrotropin-releasing hormone-stimulated GH3 cells by perturbing the function of plasma membrane integral proteins." Endocrinology 138(1): 264-272.
- Perez, F. R., V. Pineiro, et al. (2003). "Vascular wall: potential target for the physicochemical effects of cis-unsaturated free fatty acids." Microsc Res Tech 60(1): 23-29.
- Pernow, J., L. Kaijser, et al. (1996). "Comparable potent coronary constrictor effects of endothelin-1 and big endothelin-1 in humans." Circulation 94(9): 2077-2082.
- Pfeifer, A., P. Klatt, et al. (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." EMBO J 17(11): 3045-3051.
- Pilz, S., H. Scharnagl, et al. (2006). "Free fatty acids are independently associated with all-cause and cardiovascular mortality in subjects with coronary artery disease." J Clin Endocrinol Metab 91(7): 2542-2547.
- Pjura, W. J., A. M. Kleinfeld, et al. (1984). "Partition of fatty acids and fluorescent fatty acids into membranes." Biochemistry 23(9): 2039-2043.
- Pohl, U., J. Holtz, et al. (1986). "Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo." Hypertension 8(1): 37-44.
- Predescu, S. A., D. N. Predescu, et al. (2007). "Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293(4): L823-842.
- Qiu, B., J. N. Hu, et al. (2012). "Caspase pathway of elaidic acid (9t-C18:1)-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells." Cell Biol Int 36(3): 255-260.
- Quilley, J. and J. C. McGiff (2000). "Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid?" Trends Pharmacol Sci 21(4): 121-124.
- Radomski, M. W., R. M. Palmer, et al. (1987). "The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide." Br J Pharmacol 92(3): 639-646.
- Ramirez, O. T. and R. Mutharasan (1992). "Effect of serum on the plasma membrane fluidity of hybridomas: an insight into its shear protective mechanism." Biotechnol Prog 8(1): 40-50.
- Reaven, G. M., C. Hollenbeck, et al. (1988). "Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM." Diabetes 37(8): 1020-1024.
- Reiter, R. J. (1998). "Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin." Prog Neurobiol 56(3): 359-384.
- Renaud, G., M. E. Bouma, et al. (1985). "Free fatty-acid uptake by isolated rat hepatocytes." Arch Int Physiol Biochim 93(4): 313-319.
- Renkin, E. M. and F. E. Curry (1978). Transport of water and solutes across capillary endothelium. Berlin, Springer-Verlag.

- Rietveld, A. G., M. C. Koorengevel, et al. (1995). "Non-bilayer lipids are required for efficient protein transport across the plasma membrane of *Escherichia coli*." EMBO J 14(22): 5506-5513.
- Risso, A., F. J. Pellegrino, et al. (2014). "Essential Fatty Acids Use to Improve Male Reproductive Parameters." 34 (1-2): 33-41.
- Roach, C., S. E. Feller, et al. (2004). "Comparison of cis and trans fatty acid containing phosphatidylcholines on membrane properties." Biochemistry 43(20): 6344-6351.
- Robaye, B., R. Mosselmans, et al. (1991). "Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro." Am J Pathol 138(2): 447-453.
- Romeo, F., D. Li, et al. (2000). "Carvedilol prevents epinephrine-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells: modulation of Fas/Fas ligand and caspase-3 pathway." Cardiovasc Res 45(3): 788-794.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature 362(6423): 801-809.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med 340(2): 115-126.
- Rossig, L., S. Dimmeler, et al. (2001). "Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis." Basic Res Cardiol 96(1): 11-22.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell 68(4): 673-682.
- Rudini, N. and E. Dejana (2008). "Adherens junctions." Curr Biol 18(23): R1080-1082.
- Ryan, M., D. McInerney, et al. (2000). "Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity." QJM 93(2): 85-91.
- Sala-Vila, A., E. S. Romero-Mamani, et al. (2014). "Changes in ultrasound-assessed carotid intima-media thickness and plaque with a Mediterranean diet: a substudy of the PREDIMED trial." Arterioscler Thromb Vasc Biol 34(2): 439-445.
- Salas-Salvado, J., M. Bullo, et al. (2011). "Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial." Diabetes Care 34(1): 14-19.
- Salas-Salvado, J., J. Fernandez-Ballart, et al. (2008). "Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial." Arch Intern Med 168(22): 2449-2458.
- Sallee, J. L., E. S. Wittchen, et al. (2006). "Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases: II. Cell-cell adhesion." J Biol Chem 281(24): 16189-16192.
- Sanderson, P., P. Yaqoob, et al. (1995). "Effects of dietary lipid manipulation upon graft vs host and host vs graft responses in the rat." Cell Immunol 164(2): 240-247.
- Sandoval, R., A. B. Malik, et al. (2001). "Ca(2+) signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions." J Physiol 533(Pt 2): 433-445.
- Sato, N., K. Kokame, et al. (1998). "Lysophosphatidylcholine decreases the synthesis of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells." Thromb Haemost 79(1): 217-221.
- Schafer, K. A. (1998). "The cell cycle: a review." Vet Pathol 35(6): 461-478.
- Schafer, M., N. Ewald, et al. (2003). "Signaling of hypoxia-induced autonomous proliferation of endothelial cells." FASEB J 17(3): 449-451.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell 103(2): 211-225.
- Schmitz, I., S. Kirchhoff, et al. (2000). "Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways." Int J Biochem Cell Biol 32(11-12): 1123-1136.
- Seddon, J. M. (1990). "Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids." Biochim Biophys Acta 1031(1): 1-69.
- Serra-Majem, L., B. Roman, et al. (2006). "Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review." Nutr Rev 64(2 Pt 2): S27-47.
- Shen, Q., M. H. Wu, et al. (2009). "Endothelial contractile cytoskeleton and microvascular permeability." Cell Health Cytoskeleton 2009(1): 43-50.

- Shi, W., M. E. Haberland, et al. (2000). "Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice." Circulation 102(1): 75-81.
- Shichiri, M., H. Kato, et al. (1997). "Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells." Hypertension 30(5): 1198-1203.
- Siegel, D. P. (1986). "Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases. II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion." Biophys J 49(6): 1171-1183.
- Siegel, D. P., J. Banschbach, et al. (1989). "Physiological levels of diacylglycerols in phospholipid membranes induce membrane fusion and stabilize inverted phases." Biochemistry 28(9): 3703-3709.
- Simionescu, N., M. Simionescu, et al. (1978). "Open junctions in the endothelium of the postcapillary venules of the diaphragm." J Cell Biol 79(1): 27-44.
- Singh, J. K., A. Dasgupta, et al. (1996). "Apoptosis is associated with an increase in saturated fatty acid containing phospholipids in the neuronal cell line, HN2-5." Biochim Biophys Acta 1304(3): 171-178.
- Smith, G. C., R. A. Coleman, et al. (1994). "Characterization of dilator prostanoid receptors in the fetal rabbit ductus arteriosus." J Pharmacol Exp Ther 271(1): 390-396.
- Sousa, C., C. Nunes, et al. (2008). "Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the cellular membrane fluidity." J Pharm Sci 97(8): 3195-3206.
- Spector, A. A. and M. A. Yorek (1985). "Membrane lipid composition and cellular function." J Lipid Res 26(9): 1015-1035.
- Spyridopoulos, I., A. B. Sullivan, et al. (1997). "Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor." Circulation 95(6): 1505-1514.
- Staines, D. and P. Price (2003). Managing Serum Requirements for Cell Culture. Grand Island, NY, GIBCO Cell Culture Invitrogen Corporation
- Stankevicius, E., E. Kevelaitis, et al. (2003). "[Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]." Medicina (Kaunas) 39(4): 333-341.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, et al. (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation 92(5): 1355-1374.
- Stender, S. and J. Dyerberg (2004). "Influence of trans fatty acids on health." Ann Nutr Metab 48(2): 61-66.
- Stoneman, V. E. and M. R. Bennett (2004). "Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications." Clin Sci (Lond) 107(4): 343-354.
- Storch, J. and A. M. Kleinfeld (1985). "The lipid structure of biological membranes." Trends in Biochemical Sciences 10(11): 418-421.
- Stubbs, C. D. and A. D. Smith (1984). "The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function." Biochim Biophys Acta 779(1): 89-137.
- Sudano, I., L. E. Spieker, et al. (2006). "Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions." J Cardiovasc Pharmacol 47 Suppl 2: S136-150; discussion S172-136.
- Sudano, I., A. Viridis, et al. (2007). "Chronic treatment with long-acting nifedipine reduces vasoconstriction to endothelin-1 in essential hypertension." Hypertension 49(2): 285-290.
- Sumida, C., R. Graber, et al. (1993). "Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 48(1): 117-122.
- Surette, M. E., J. D. Winkler, et al. (1996). "Relationship between arachidonate--phospholipid remodeling and apoptosis." Biochemistry 35(28): 9187-9196.
- Szabadkai, G. and R. Rizzuto (2004). "Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood?" FEBS Lett 567(1): 111-115.
- Takahashi, T., H. Ueno, et al. (1999). "VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells." Oncogene 18(13): 2221-2230.

- Tall, A. R., X. Jiang, et al. (2000). "1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(5): 1185-1188.
- Taub, D. D. and J. J. Oppenheim (1993). "Review of the chemokine meeting the Third International Symposium of Chemotactic Cytokines." Cytokine 5(3): 175-179.
- Taylor, S. G. and A. H. Weston (1988). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium." Trends Pharmacol Sci 9(8): 272-274.
- Tebbey, P. W. and T. M. Buttke (1990). "Molecular basis for the immunosuppressive action of stearic acid on T cells." Immunology 70(3): 379-384.
- Teres, S., G. Barcelo-Coblijn, et al. (2008). "Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil." Proc Natl Acad Sci U S A 105(37): 13811-13816.
- Thorburn, A. (2004). "Death receptor-induced cell killing." Cell Signal 16(2): 139-144.
- Toborek, M. and S. Kaiser (1999). "Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis." Basic Res Cardiol 94(5): 295-314.
- Tolleshaug, H., K. K. Hobgood, et al. (1983). "The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor." Cell 32(3): 941-951.
- Trichopoulou, A., T. Costacou, et al. (2003). "Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population." N Engl J Med 348(26): 2599-2608.
- Trichopoulou, A., A. Kouris-Blazos, et al. (1995). "Diet and overall survival in elderly people." BMJ 311(7018): 1457-1460.
- Tsimikas, S., A. Philis-Tsimikas, et al. (1999). "LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol 19(1): 122-130.
- Tunstall-Pedoe, H., K. Kuulasmaa, et al. (1999). "Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease." Lancet 353(9164): 1547-1557.
- Turner, D. C. and S. M. Gruner (1992). "X-ray diffraction reconstruction of the inverted hexagonal (HII) phase in lipid-water systems." Biochemistry 31(5): 1340-1355.
- Urpi-Sarda, M., R. Casas, et al. (2012). "Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis." Pharmacol Res 65(6): 577-583.
- van Hinsbergh, V. W. (1997). "Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation." Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(6): 1018-1023.
- Vanhoutte, P. M. (1991). "Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets." Eur Heart J 12 Suppl E: 25-32.
- Vanhoutte, P. M. (2003). "Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease." Circ J 67(7): 572-575.
- Varani, J., I. Ginsburg, et al. (1989). "Endothelial cell killing by neutrophils. Synergistic interaction of oxygen products and proteases." Am J Pathol 135(3): 435-438.
- Verhamme, P. and M. F. Hoylaerts (2006). "The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis." Acta Clin Belg 61(5): 213-219.
- Verma, S. and T. J. Anderson (2002). "Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist." Circulation 105(5): 546-549.
- Verma, S., M. R. Buchanan, et al. (2003). "Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease." Circulation 108(17): 2054-2059.
- Vicario, I. M., D. Malkova, et al. (1998). "Olive oil supplementation in healthy adults: effects in cell membrane fatty acid composition and platelet function." Ann Nutr Metab 42(3): 160-169.
- Viles-Gonzalez, J. F., V. Fuster, et al. (2004). "Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences." Eur Heart J 25(14): 1197-1207.
- Vincent, P. A., K. Xiao, et al. (2004). "VE-cadherin: adhesion at arm's length." Am J Physiol Cell Physiol 286(5): C987-997.

- Vincenz, C. (2001). "Death receptors and apoptosis. Deadly signaling and evasive tactics." Cardiol Clin 19(1): 31-43.
- Visser, M. C., J. M. Pullar, et al. (1999). "Hypochlorous acid causes caspase activation and apoptosis or growth arrest in human endothelial cells." Biochem J 344 Pt 2: 443-449.
- Vogel, R. A. (2000). "The Mediterranean diet and endothelial function: why some dietary fats may be healthy." Cleve Clin J Med 67(4): 232, 235-236.
- Vogler, O., J. Casas, et al. (2004). "The Gbetagamma dimer drives the interaction of heterotrimeric Gi proteins with nonlamellar membrane structures." J Biol Chem 279(35): 36540-36545.
- Walker, F. J., P. W. Sexton, et al. (1979). "The inhibition of blood coagulation by activated Protein C through the selective inactivation of activated Factor V." Biochim Biophys Acta 571(2): 333-342.
- Walter, D. H., J. Haendeler, et al. (1998). "Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria." Circulation 98(12): 1153-1157.
- Wang, N., L. Verna, et al. (1999). "c-Jun triggers apoptosis in human vascular endothelial cells." Circ Res 85(5): 387-393.
- Wei, E. P., H. A. Kontos, et al. (1996). "Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite." Am J Physiol 271(3 Pt 2): H1262-1266.
- Weisiger, R. A. and W. L. Ma (1987). "Uptake of oleate from albumin solutions by rat liver. Failure to detect catalysis of the dissociation of oleate from albumin by an albumin receptor." J Clin Invest 79(4): 1070-1077.
- World Health Organization, W. (2007). Prevention of cardiovascular disease: Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk. WHO. Geneva.
- World Health Organization, W. (2008). Action plan for the global strategy for prevention and control of noncommunicable diseases. WHA61.14. WHO. Geneva.
- World Health Organization, W. (2008). The global burden of disease: 2004 update. WHO. Geneva.
- World Health Organization, W. (2009). Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. WHO. Geneva.
- World Health Organization, W. (2011). Causes of death 2008: data sources and methods Geneva, Department of Health Statistics and Informatics.
- World Health Organization, W. (2011). World health statistics 2011. WHO. Geneva.
- Wu, M. H. (2005). "Endothelial focal adhesions and barrier function." J Physiol 569(Pt 2): 359-366.
- Wyllie, A. H., R. G. Morris, et al. (1984). "Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis." J Pathol 142(1): 67-77.
- Yam, D., A. Eliraz, et al. (1996). "Diet and disease--the Israeli paradox: possible dangers of a high omega-6 polyunsaturated fatty acid diet." Isr J Med Sci 32(11): 1134-1143.
- Yaqoob, P. (1998). "Lipids and the immune response." Curr Opin Clin Nutr Metab Care 1(2): 153-161.
- Yehuda, S., S. Rabinovitz, et al. (2002). "The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane." Neurobiol Aging 23(5): 843-853.
- Yoshida, S., M. Ikeda, et al. (1986). "Cerebral phosphoinositide, triacylglycerol, and energy metabolism in reversible ischemia: origin and fate of free fatty acids." J Neurochem 47(3): 744-757.
- Yuan, S. Y. and R. R. Rigor (2010). Regulation of Endothelial Barrier Function. San Rafael (CA), Morgan & Claypool Life Sciences.
- Yusuf, S. (2002). "Two decades of progress in preventing vascular disease." Lancet 360(9326): 2-3.
- Zachary, I. and G. Glikli (2001). "Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family." Cardiovasc Res 49(3): 568-581.
- Zannis, V. I. and J. L. Breslow (1985). "Genetic mutations affecting human lipoprotein metabolism." Adv Hum Genet 14: 125-215, 383-126.
- Zapolska-Downar, D., A. Kosmider, et al. (2005). "Trans fatty acids induce apoptosis in human endothelial cells." J Physiol Pharmacol 56(4): 611-625.
- Zeihner, A. M., B. Fisslthaler, et al. (1995). "Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells." Circ Res 76(6): 980-986.

- Zimmer, G. and H. J. Freisleben (1988). Membrane fluidity determination for viscosity. C. C. C. a. L. M. G. A. R. Liss. New York.
- Zock, P. L. and M. B. Katan (1992). "Hydrogenation alternatives: effects of trans fatty acids and stearic acid versus linoleic acid on serum lipids and lipoproteins in humans." J Lipid Res 33(3): 399-410.
- Zugaza, J. L., X. A. Casabiell, et al. (1995a). "Oleic acid blocks EGF-induced $[Ca^{2+}]_i$ release without altering cellular metabolism in fibroblast EGFR T17." Biochem Biophys Res Commun 207(1): 105-110.
- Zugaza, J. L., X. A. Casabiell, et al. (1995). "Pretreatment with oleic acid accelerates the entrance into the mitotic cycle of EGF-stimulated fibroblasts." Exp Cell Res 219(1): 54-63.

